VIRUS-ARTIGE PARTIKEL IN EINER MITOCHONDRIALEN MUTANTE VON *Neurospora crassa*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Iqbal Unnisa Ali
aus
Karachi/Pakistan

Göttingen 1974

D 7

" Gedruckt mit Unterstützung des

deutschen akademischen Austauschdienst "

VIRUS-ARTIGE PARTIKEL IN EINER MITOCHONDRIALEN MUTANTE VON *Neurospora crassa*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Iqbal Unnisa Ali
aus
Karachi/Pakistan

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Dr. Hans Küntzel

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Gottschalk

eingereicht am: 21.3.1974

mündliche Prüfung am: 2.5.1974

Meiner Mutter gewidmet

Diese Arbeit wurde in der Zeit von März 1972 bis Februar 1974 am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen in der Abteilung Chemie unter der Leitung von Herrn Dr. Hans Küntzel durchgeführt.

Herrn Dr. H. Küntzel danke ich herzlich für wertvolle Ratschläge, Anregungen und seine stete Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. F. Cramer möchte ich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt ferner den Herren Dr. M. Sprinzl, Dr. G. Steinheider, Dr. H.H. Althaus und Dr. D. Gauss.

Herrn Dr. J. Kind danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Weiter danke ich herzlich Frau B. Reiter für das ausgezeichnete Schreiben der Arbeit sowie Frau A. Danzmann und Frau B. Schiller für ihre Hilfe während der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534922_0029

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG.....1

1.1. Biogenese der Mitochondrien.....1

1.2. Virus-artige Partikel in einer extranuclearen Mutante von Neurospora crassa.....5

1.3. Fungale virus-artige Partikel.....5

1.4. Problemstellung.....6

2. METHODEN.....8

2.1. Materialien.....8

2.2. Nährmedium.....9

2.3. Züchtung.....9

2.4. Isolation der virus-artigen Partikel (VLP).....1o

2.5. Isolation von Mitochondrien und mitochondrialer DNA aus Neurospora crassa (Wildtyp).....11

2.6. Isolation der cytoplasmatischen und mitochondrialen Ribosomen.....11

2.7. Isolation von E.coli Ribosomen.....13

2.8. Markierung von abnormal-3 Kulturen.....14

2.9. Isolation von RNA.....14

2.9.1. Mitochondrien.....14

2.9.2. Mitochondriale Ribosomen.....15

2.9.3. E.coli Ribosomen.....15

2.9.4. PMS-VLP.....15

Seite

2.1o. Aufreinigung der RNA.....16

2.11. Wachstums-Charakteristika von abnormal-3.....16

2.12. Dichtegradientenzentrifugation von VLP.....17

2.13. Exponentielle Sucrose-Gradienten von Ribosomen.....18

2.14. Zeitlicher Verlauf der RNase-Abbaureaktion von VLP-RNA..18

2.15. Alkalischer Abbau von VLP-RNA.....19

2.16. DNase Behandlung von VLP-RNA.....19

2.17. Bestimmung der Basenzusammensetzung von VLP-RNA.....19

2.18. Exponentielle Sucrose-Gradienten von VLP-RNA.....2o

2.18.1. Native RNA.....2o

2.18.2. Thermisch denaturierte RNA.....2o

2.19. Gel-Elektrophorese von VLP-RNA.....21

2.2o. Hybridisierung.....22

2.21. Radiojodierung von VLP.....24

2.22. Translation der VLP-RNA in Oozyten.....25

2.23. Sephadex-Säulenchromatographie.....26

2.24. Chemische Bestimmungen und sonstige Methoden.....26

3. ERGEBNISSE.....27

3.1. Zellfraktionierung und Isolierung der VLP.....27

3.2. Wachstumscharakteristika von abnormal-3.....29

3.3. Cytoplasmatische und mitochondriale Ribosomen von abnormal-3.....33

3.4. Struktur und chemische Zusammensetzung der VLP.....38

3.4.1. Gleichgewichts-Dichtegradienten-Zentrifugation der VLP.....41

Seite

3.4.2. Radio-Jodierung des Envelop-Proteins von VLP durch Lactoperoxidase....46

3.4.3. Einzelsträngigkeit der VLP-RNA....48

3.4.4. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten von VLP-RNA....53

3.5. Hybridisierung der VLP-RNA mit mt-DNA aus Neurospora crassa (Wildtyp)....58

3.6. Translation der VLP-RNA in Oozyten....61

4. DISKUSSION....63

5. ZUSAMMENFASSUNG....7o

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS....72

LITERATURVERZEICHNIS....73

LEBENSLAUF....78

1. EINLEITUNG

1.1. Biogenese der Mitochondrien

Die Entdeckung von DNA in Mitochondrien (1-4) führte in den letzten 10 Jahren zu intensiven Untersuchungen über die Funktion und Biogenese dieser Organellen. Dabei stellte sich heraus, daß Mitochondrien eine gewisse Autonomie im genetischen Sinne haben. Alle funktionsfähigen Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom und einen eigenen genetischen Apparat für die Replikation und Expression dieses Genoms. Die Komponenten dieses genetischen Systems, nämlich DNA- und RNA-Polymerasen, tRNAs, Aminoacyl-tRNA Synthetasen, Ribosomen und andere Enzyme unterscheiden sich völlig von denen des cytoplasmatischen genetischen Systems.

Der Informationsgehalt des Genoms tierischer Mitochondrien vom Molekulargewicht 10×10^6 ist jedoch für die Codierung der Komponenten des mitochondrialen genetischen Systems nicht ausreichend. Die etwa 5-fach größere mt-DNA von Pilzen, wie z.B. Hefe und Neurospora crassa, scheint nach den bisher bekannten Untersuchungen auch keine zusätzliche Information zu besitzen, die auf der tierischen mt-DNA nicht auch vorhanden wäre.

Die biologische Funktion sowie die Struktur der Mitochondrien beruhen auf der engen Koordination zweier genetischer Systeme, nämlich des kernabhängigen und des mitochondrialen Systems. Ein erheblicher Anteil der mitochondrialen Proteine, einschließlich der der Matrix, der äußeren Membran, der meisten Proteine der inneren Membran, der Enzymproteine des mitochondrialen genetischen Apparats wird erst nach der Synthese im Cytoplasma in die Mitochondrien importiert (5,6).

Das mitochondriale Genom ist ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Molekül, dessen Länge von 5 µm (in tierischen Geweben) bis 30 µm (in höheren Pflanzen) variiert (7). Der einzige Organismus, in dem nur eine lineare mt-DNA der Länge 15 mµ gefunden wird, ist die Protozoe Tetrahymena (8,9). Aus Hybridisierungsdaten geht hervor, daß mitochondriale und Kern-DNA keine Sequenzhomologie aufweisen (1o,11).

Hybridisierungsdaten beweisen ebenfalls, daß mt-DNA für mt-rRNAs und tRNAs codiert. In allen bisher untersuchten Organismen, also auch in Neurospora (12) enthält das mitochondriale Genom je ein Cistron für die rRNAs und ca. 11-2o Cistrons für tRNAs (7).

In Xenopus laevis (13) und in HeLa Zellen (14) sind die rRNA-Cistrons auf dem schweren Strang der mt-DNA lokalisiert. In HeLa-Zellen konnte elektronoptisch gezeigt werden, daß die beiden rRNA-Cistrons benachbart liegen (15). Das Tandem-Gen der beiden ribosomalen RNAs wird in Neurospora in Form einer 32S-RNA transkribiert und in mehreren Schritten in 23S und 16S rRNAs zerlegt (16). Die Zahl der mitochondrialen tRNA-Gene variiert in verschiedenen Organismen. In Hefe findet man 2O tRNA-Gene (17), während in Xenopus laevis nur 15 (13) und in HeLa-Zellen nur 12 Gene nachgewiesen wurden (14,15).

Die Verwendung bestimmter Antibiotika, die bevorzugt entweder den cytoplasmatischen oder mitochondrialen proteinsynthetisierenden Apparat ausschalten, hat sich im Rahmen der Untersuchung der mitochondrialen Biogenese als sehr vorteilhaft erwiesen. Unter Verwendung zweier solcher spezifischer Antibiotika, Chloramphenicol and Cycloheximid, die die mitochondriale bzw. cytoplasmatische Proteinsynthese inhibieren, konnte gezeigt werden, daß wahrscheinlich alle mitochondrialen ribosomalen Proteine an cytoplasmatischen Ribosomen

synthetisiert werden (18-2o). Die mitochondrialen rRNAs zusammen mit diesen importierten Proteinen bilden dann in Neurospora die mitochondrialen 73S Ribosomen (21).

Auch alle bisher untersuchten Enzyme des mitochondrialen genetischen Apparates, wie DNA- und RNA-Polymerasen, ribosomale Translocase und methionyl-tRNA Transformylase (22-24) werden von Kern-DNA codiert und an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert.

Die Proteine der äußeren Membran und der Matrix werden ebenfalls von Kern-DNA codiert und an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert, während an der Biosynthese der inneren Membran sowohl die kern- als auch die mitochondrialen Gene beteiligt sind (6). Jedoch liefert die mitochondriale Protein-Synthese höchstens etwa 15 % der gesamten mitochondrialen Proteine (25). Die mitochondrialen Produkte, obwohl von geringer Anzahl, scheinen für die Zelle von großer Bedeutung zu sein.

Die folgenden Funktionen könnten den in Mitochondrien synthetisierten Proteinen zugeordnet werden.

1. Regulation der mitochondrialen Proteine, die von Kern-DNA codiert werden (23). Die Überproduktion von mitochondrialer DNA-Polymerase (22) und RNA-Polyermase in Ethidium-Bromid bzw. Chloramphenicol behandelten Zellen (24) unterstützt diese Hypothese.
2. Die Regulation des Wachstums. Hinweise dafür kommen von extrachromosomalen Mutanten von Neurospora (26).
3. Die Kontrolle der Sexual-Organe bzw. der protoperithezialen Bildung. Manche extrachromosomale Mutanten von Neurospora sprechen ebenfalls für diese Funktion der mitochondrialen Proteine (26).

4. Der Aufbau der inneren mitochondrialen Membran, die Organisation der Atmungskette und der Enzyme der oxidativen Phosphorylierung.

Als Beispiel dafür gelten die atmungsdefekten rho⁻-Petit-Mutanten von Hefe (27) und die extranukleären mi-Mutanten von Neurospora (28).

Bisher identifizierte mitochondriale Translationsprodukte in Neurospora crassa und Hefe sind die drei schweren Untereinheiten von Cytochromoxidase, das Apoprotein von Cytochrom b und ein mit der ATPase assoziiertes Proteolipid (6).

Die genetische Herkunft dieser Proteine war bisher unklar, und es wurde die Möglichkeit diskutiert, daß mitochondriale Ribosomen importierte nukleare messenger RNA übersetzen (29). Neuere Versuche der in vitro Transcription und Translation mitochondrialer DNA zeigen allerdings, daß mitochondriale DNA Gene für Proteine enthält (3o,31). Die primären Translationsprodukte dieser Gene haben im Falle von Neurospora Molgewichte von 12 000 und 10 000 (32). Aus Pulsmarkierungsversuchen in Neurospora wurde geschlossen, daß auch in vivo zunächst Polypeptide vom Molgewicht um 11 000 an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert werden und dann anschließend in höher-molekulare Proteinkomplexe umgewandelt werden (33).

Zur genauen Identifizierung mitochondrialer Genprodukte ist die biochemische Untersuchung mitochondrialer Mutanten notwendig. Im Falle von Neurospora lassen sich solche Mutanten von Kernmutanten leicht dadurch unterscheiden, daß sie einen streng mütterlichen Erbgang zeigen.

1.2. Virus-artige Partikel in einer mitochondrialen Mutante von Neurospora

Die meisten mitochondrialen Mutanten von Neurospora lassen sich phänotypisch durch Atmungsdefekt, anormales Cytochromspektrum (Mangel an Cytochrom a und b, Überschuß an Cytochrom c) und langsames Wachstum charakterisieren (28). Die Mutante "abnormal-3", die in dieser Arbeit näher untersucht wird, hat einige ungewöhnliche, ja einzigartige genotypische und phänotypische Eigenschaften:

1. Die mitochondriale DNA hat eine geringere Dichte als die von Wildtyp-Neurospora (34).
2. Das Cytochrom-Spektrum ist normal (35).
3. Die ATPase ist Oligomycin-resistent (35).
4. Die Mutante wächst extrem langsam, obwohl sie nicht atmungsdefekt ist.
5. Die Mutante ist morphologisch abnormal, sie entwickelt keine Perithecien und Konidien und kann deshalb nur vegetativ vermehrt werden.
6. Sie produziert in großen Mengen virus-artige Partikel (36).

Im Laufe dieser Arbeit wird der Beweis erbracht werden, daß diese virus-artigen Partikel aus mitochondrialen Genprodukten bestehen. Bevor auf die spezielle Fragestellung eingegangen wird, noch ein Wort zu fungalen Viren oder virus-artigen Partikeln.

1.3. Fungale virus-artige Partikel

Intrazelluläre Partikel, die sowohl morphologisch als auch chemisch den klassischen Viren ähneln, sind in zahlreichen Pilzarten gefunden worden. Hollings (37) entdeckte im Agaricus bisporus ca. 25 µm große sphärische virus-artige Partikel, die eine Degeneration in Myzelien verursachten. Hier

konnte die Transmission von normalen Pilzen entweder durch Übertragung von pathogenen Myzelien oder durch Infizierung von gereinigten VLP in die Sporen erzielt werden. Seitdem sind solche VLP aus verschiedenen Spezies von Penicillium, Aspergillus und Saccharomyces isoliert worden (38-4o). Diese VLP sind ca. 25 - 40 µm große polyhedrale Nucleoproteine, die ausschließlich doppelsträngige RNA enthalten.

Als virus-artige Partikel (virus-like particles, VLP) werden intrazelluläre Komponenten bezeichnet, die elektronenoptisch, physikochemisch und chemisch virus-ähnlich erscheinen, für die jedoch in der Regel keine Infektiosität nachgewiesen werden kann. VLP wurden erstmalig von Tuveson und Peterson (41) aus mitochondrialen Mutanten von Neurospora isoliert und morphologisch charakterisiert.

1.4. Problemstellung

In dieser Arbeit sollen virus-artige Partikel aus einer Mutante von Neurospora mit veränderter mitochondrialer DNA (abnormal-3) isoliert und charakterisiert werden. Ferner soll die genetische und biochemische Herkunft dieser Partikel und ein möglicher Zusammenhang mit einer mitochondrialen Mutation untersucht werden. Das Problem wird in folgende Teilfragen zerlegt:

1. Analyse der Zellbestandteile und des Gehalts an VLP in verschiedenen Phasen der Wachstumsperiode.
2. Charakterisierung der cytoplasmatischen und mitochondrialen Ribosomen und Vergleich mit Ribosomen aus Wildtyp und E.coli.
3. Morphologische und chemische Charakterisierung von VLP.
4. Dichtebestimmung von VLP in CsCl und Sucrose-Gradienten.

5. Lokalisierung der VLP-Proteine unter Verwendung von bestimmten nicht-ionischen Detergenzien und spezifischen Jodierungsmethoden.
6. Die Charakterisierung der VLP-RNA durch Bestimmung der Basen-Zusammensetzung, der Sekundärstruktur und des Sedimentationskoeffizienten unter normalen und denaturierenden Bedingungen.
7. Die Bestimmung der genetischen Herkunft der VLP-RNA durch DNA-RNA Hybridisierung.
8. Übersetzung der VLP-RNA in Oozyten von Xenopus laevis.

2. METHODEN

2.1. Materialien

Acrylamid und N,N'-Methylen-diacrylamid - Merck.

Alkalische Phosphatase - Boehringer.

Aquasol - New England Nuclear.

BSA - Serva.

Cyt. C - Serva.

DNase - Worthington.

Hefe-Extrakt - Difco.

Lactoperoxidase - Sigma.

Potatodextrose-Agar - Oxoid.

Pronase - Serva

Radioisotopen: [^{3}H]Adenosin, [^{3}H]Leucin, [^{14}C]Leucin, [^{3}H]Glucosamin, [^{14}C]Glucosamin, [^{3}H]Uracil - Schwarz/Mann.

[^{125}I]NaI (carrier-free) - Amersham

Na [^{32}P]Phosphat - Amersham

RNase A - Worthington

RNase T_1 - Boehringer

SVD - Boehringer

TEMED - E.C. Apparatus Corp.

[^{14}C]tRNA - von Dr. von der Haar erhalten.

RNase A (1 mg/ml in 0.15 M NaCl, pH 5.1) wurde 10 Minuten bei 90°C erhitzt und bei - 20°C aufbewahrt.

Pronase (20 mg/ml) wurde 2 Stunden bei 37°C vorverdaut; das unlösliche Material wurde abzentrifugiert und die Lösung bei -20°C aufbewahrt.

2.2. Nährmedium

39 g Potatodextrose-Agar wurden in 1 l bidestilliertem Wasser gelöst und abfiltriert. Zu dem Filtrat wurden 5 g Hefe-Extrakt gegeben.

a) Schrägkulturen: 3.9 g Potatodextrose-Agar/100 ml H_2O, 5 bis 6 ml dieser Lösung pro Kultur

b) Vorzuchten: 250 ml Erlenmeyer-Kolben enthielten 100 ml des Nährmediums

c) Hauptzuchten: 1 l Erlenmeyer-Kolben enthielten 250 ml des Nährmediums.

Alle Lösungen wurden ca. 30 Minuten autoklaviert.

2.3. Züchtung

Die extranukleare Mutante abnormal-3 von Neurospora wurde vom Fungal Genetic Stock Center in Arcata, California, erhalten. Sie wird dort unter der Stock Nr. 1448 als die von Garnjobst et al. (42) isolierte Mutante abnormal-1 geführt. Genetische Untersuchungen im Labor von Dr. Küntzel haben jedoch ergeben, daß die mehrmals unter dieser Bezeichnung erhaltene Mutante mit der von Garnjobst beschriebenen Mutante nicht identisch sein kann. Sie unterscheidet sich u.a. darin, daß sie keine Inositol-Auxotrophie zeigt und ein normales Cytochrom-Spektrum aufweist. Leider konnte bisher die genetische Herkunft der von uns als abnormal-3 bezeichneten Mutante nicht geklärt werden.

Die Mutante abnormal-3 wurde durch hyphale Übertragung auf Schrägkulturen gezüchtet. Jeweils eine Schrägkultur diente zur Überimpfung einer Vorzucht. In Gegenwart von 5-6 ml des Nährmediums wurde die Schrägkultur mit einer Nadel abgekratzt und die Hyphensuspension anschließend in den Vorzuchtkolben gegossen. Die Vorzuchtkolben wurden 3 Tage im Brutraum bei 30°C in einem "Gyratory Shaker" Modell G76 bei 50-60 UPM geschüttelt. Nach 3 Tagen wurden die kugelförmigen Zellkolonien einer Vorzucht unter streng sterilisierten Bedingungen auf 3-4 Hauptzuchtkolben verteilt, die 1-6 Tage bei 30°C weitergeschüttelt wurden.

2.4. Isolation der virus-artigen Partikel (VLP)

Pufferlösungen:

GM = 100 mM Glycin, 10 mM $MgCl_2$ pH 7.0.

GMS = 100 mM Glycin, 10 mM $MgCl_2$ pH 7, 0.44 M Sucrose.

GMS = 50 %, 34 %, 23 % Sucrose in GM (w/w).

ET = 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5.

EDTA = 10 mM Tris-HCl pH 7.5.

ETS = 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 0.44 M Sucrose pH 7.5.

ETS 1.95, 1.5, 0.9 = 1.95 M, 1.5 M, 0.9 M Sucrose in ET.

Die Hyphen der Hauptzuchten wurden auf einen Büchner-Trichter abgesaugt (alle Schritte erfolgten bei 4°C), mit ca. zweifacher Menge des Zellenfeuchtgewichts an Seesand zerrieben und in GMS suspendiert. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der postnucleare Überstand (PNS) dieser Zentrifugation wurde 15 Minuten bei 18 000 rpm im SS 34 Rotor abzentrifugiert. Das rohe mitochondriale Pellet wurde für die Isolation der mitochondrialen VLP bzw. Ribosomen verwendet.

Der postmitochondriale Überstand (PMS) wurde auf einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten mit 50 %, 34 % (2 - 4 ml) und 23 % GMS geschichtet. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 25 000 rpm im Spinco SW 25.2 bzw. SW 27 Rotor wurde die grünliche Bande in der 34 %igen GMS-Schicht isoliert und mit GM auf das zweifache Volumen verdünnt. Die VLP wurden 20 Minuten bei 40 000 rpm im Spinco R 40 Rotor pelletiert.

Nach Suspension der VLP in GM wurde die Gradientenzentrifugation wiederholt. Die Dauer der Zentrifugation war 20 Minuten bei 35 000 rpm. Nach Verdünnung

der VLP-Bande und zweiter Pelletierung wurden die VLP in GM suspendiert. Das rohe mitochondriale Pellet wurde in GMS suspendiert und die Suspension auf den diskontinuierlichen Gradienten mit 1.95, 1.5 und 0.9 ETS Schichten aufgetragen (43). Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 25 000 rpm im Spinco SW 25.2 Rotor wurde die mitochondriale Bande isoliert, mit 3 Volumen ET verdünnt und 15 Minuten bei 18 000 rpm im SS 34 Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in GM aufgelöst und mit 0.1 Volumen 20 % Triton x-100 versetzt.

Die Isolation der VLP vom mitochondrialen Lysat geschah nach der beschriebenen Methode der VLP-Isolation aus PMS.

2.5. Isolation von Mitochondrien und mitochondrialer DNA aus Neurospora crassa (Wildtyp)

Neurospora crassa (Wildtyp Em 5256) wurde nach Sala und Küntzel (44) gezüchtet.

Die angewendete Methode für die Isolation der Mitochondrien und mitochondrialen DNA entsprach dem von Schäfer et al. (43) angegebenen Verfahren.

2.6. Isolation der cytoplasmatischen und mitochondrialen Ribosomen

Pufferlösungen: GM, ET, ETS 1.95, 1.5 und 0.9 wie unter 2.4. beschrieben.

AMT = 100 mM NH_4Cl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7.5.

AMTS = 0.44 M Sucrose in AMT.

Für die Isolation der Ribosomen wurde Neurospora crassa (Wildtyp) nach der von Küntzel (18) angegebenen Methode gezüchtet.

Zu dem 200 ml sterilisierten Vogel's Medium (45) in einem Erlenmeyer-Kolben wurden 250 µC [^{3}H]Leucin und ca. 5 ml Conidien-Suspension von Neurospora crassa (1.8 x 10^{7} Conidien) einpipettiert und 15 Stunden bei 30°C geschüttelt. Die Hyphen wurden über einem Büchner-Trichter abgesaugt, in AMTS suspendiert und mit Seesand zerrieben. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation in ein mitochondriales Pellet und PMS getrennt. Zentrifugationsdauer betrug 15 Minuten bei 18 000 rpm und 2°C im Rotor SS 34. Der PMS wurde auf 0.5 % Triton x-100 Konzentration gebracht und die cytoplasmatischen Ribosomen im Spinco R 65 Rotor 1 Stunde bei 60 000 rpm und 2°C pelletiert. Das rohe mitochondriale Pellet wurde in ETS suspendiert und über den üblichen ETS Gradienten (43) aufgereinigt. Die hochgereinigten Mitochondrien wurden in AMT suspendiert und mit 2 % Triton x-100 lysiert. Das Lysat wurde für die Abtrennung des unlöslichen Materials 15 Minuten bei 15 000 rpm und 2°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde im Spinco R 65 Rotor 1 Stunde bei 60 000 rpm und 2°C abzentrifugiert.

Die cytoplasmatischen und mitochondrialen Ribosomen-Pellets wurden in AMT gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Die cytoplasmatischen und mitochondrialen Ribosomen von abnormal-3 wurden aus dem Überstand des ersten diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten isoliert. Der Überstand vom PMS-Gradienten wurde mit 0.1 Volumen 20 % Triton x-100 versetzt. Zentrifugationsdauer betrug 1 Stunde bei 60 000 rpm und 2°C im Spinco R 65 Rotor.

Die Ribosomen-Pellets wurden in GM aufgelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.7. Isolation von E.coli Ribosomen

E.coli (Wildtyp) wurde gezüchtet in einem Medium, modifiziert nach Fraser und Jerrel (46). Das Zuchtmedium enthielt:

Trypton	12 g/l
Fraser-Konzentrat	5 %
Glucose	0.5 %
Kaliumphosphatpuffer	6.0 mM

Fraser-Konzentrat wurde zusammengesetzt aus:

Glycerin	50 %
Gelatine	0.2 g/l
NH_4Cl	400 mM
$MgSO_4$	40 mM
$CaCl_2$	6 mM

200 ml des Mediums mit 150 µC [^{3}H]Adenosin wurden in einem 1 l Erlenmeyer-Kolben mit einem kleinen Stückchen Agar aus E.coli Kultur beimpft und ca. 15 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde im SS 34 Rotor bei 19 000 rpm und 2°C ca. 15 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden gepoolt, bei 4°C mit Alumina zerrieben und mit TMK (Tris-HCl, 50 mM, MgAc, 10 mM, KCl, 60 mM) extrahiert. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 18 000 rpm und 2°C im SS 34 Rotor zentrifugiert. Nach der zweiten Zentrifugation des Überstands bei 18 000 rpm wurde der klare Überstand für die Isolation der Ribosomen benutzt. Die Dauer der Zentrifugation betrug 1 Stunde bei 60 000 rpm

und 2°C im Spinco R 65 Rotor. Das klare Ribosomen-Pellet wurde in TMK gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.8. Markierung von abnormal-3 Kulturen

Die [^{32}P]-Lösung wurde prinzipiell gleichzeitig mit der Vorzucht zum Hauptzuchtmedium gegeben. Die Konzentration betrug 2 mc [^{32}P]/Kolben. Das [^{32}P]-markierte Material wurde immer nach 4-tägiger Wachstumszeit geerntet.

Für alle weiteren Markierungen ([^{3}H]Leucin, [^{14}C]Leucin, [^{14}C]Glucosamin, [^{3}H]Glucosamin und [^{3}H]Uracil) wurden die Zellen zunächst 2 Tage wachsen gelassen und dann für weitere 2 Tage mit dem jeweiligen Isotop markiert (250 µC [^{3}H] Isotop und 10 µC [^{14}C] Isotop). Aus Vorversuchen hatte es sich herausgestellt, daß die Markierung von [^{3}H]- und [^{14}C] Isotopen nach 2-tägigem Wachstum effektiver war.

2.9. Isolation von RNA

2.9.1. Mitochondrien

a) Aus 12 Stunden (log-Phase) gewachsenen Neurospora crassa (Wildtyp) zellen,

b) aus 30 Stunden (stationäre Phase) gewachsenen Neurospora crassa (Wildtyp) Zellen.

2.9.2. Mitochondriale Ribosomen

Die im exponentiellen Sucrose-Gradienten (21) aufgereinigten mitochondrialen Ribosomen aus Neurospora crassa (Wildtyp).

2.9.3. E.coli Ribosomen

Aus ca. 15 Stunden gewachsenen E.coli Zellen.

2.9.4. PMS-VLP

Für die Isolation der VLP-RNA wurden grundsätzlich 4 Tage gewachsene Hauptzuchten benutzt.

Die RNA wurde nach der Methode von Brown und Littna (47) durch kaltes SDS-Phenol extrahiert. Die Mitochondrien, mitochondrialen Ribosomen, E.coli Ribosomen bzw. PMS-VLP wurden mit 1 % SDS versetzt, 2 Tropfen RNase Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugefügt, mit ca. der gleichen Menge Wasser-gesättigtem Phenol geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde nochmals mit der gleichen Menge Phenol geschüttelt und die zwei Phasen durch Zentrifugation bei 3000 rpm abgetrennt. Zu der wäßrigen Phase der zweiten Zentrifugation wurde 0.1 Volumen 5 % KAC pH 5 zugefügt und die RNA mit ca. 3 Volumen kaltem Äthanol gefällt.

Nach der zweiten Äthanolfällung und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Röhrchen mit dem RNA-Pellet bei -20°C auf dem Kopf stehengelassen. Anschließend wurde das RNA-Pellet vorsichtig in 0.1 x SSC gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Da bei den Mitochondrien die wäßrige Phase nach der Phenol-Extrahierung sowohl RNA als auch mitochondriale DNA enthielt, wurde ein zusätzlicher Schritt der DNase-Behandlung eingeführt. Nach der Alkoholfällung wurde das Pellet in MT (2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) gelöst und zunächst 30 Minuten mit 0.1 Volumen RNase-freier DNase (1 mg/ml) und dann 2 Stunden mit 0.2 Volumen (20 mg/ml) Pronase bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit der gleichen Menge Phenol geschüttelt, bei 3000 rpm zentrifugiert, die wäßrige Phase mit Chloroform:Isopentanol (5:2) extrahiert und nochmals bei 3000 rpm zentrifugiert. Wie üblich wurde die wäßrige Phase zweimal mit Äthanol gefällt, das RNA-Pellet in 0.1 x SSC gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.1o. Aufreinigung der RNA

Da die totale mitochondriale RNA aus stationären Zellen und besonders die VLP-RNA Verunreinigungen enthielt, die ein Absorptionsmaximum bei 230 mμ zeigten, wurden sie 15 Minuten bei 50 000 rpm und 2°C im Spinco R 65 Rotor zentrifugiert (48). Dabei wurden die Verunreinigungen pelletiert und der klare Überstand, der saubere RNA enthielt, wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.11. Wachstumscharakteristika von abnormal-3

Nach verschiedenen Wachstumszeiten wurden isoliert:

a) PNS

b) Mitochondrien

c) VLP (aus Mitochondrien und PMS)

d) Ribosomen (cytoplasmatische und mitochondriale).

Es wurde jeweils der Proteingehalt von allen Organellen bestimmt. Die Protein-Bestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (49).

2.12. Dichte-Gradienten-Zentrifugation von VLP

a) Aus PMS isolierte und mit [^{3}H]Leucin markierte VLP.

b) Die [^{3}H]Leucin markierten PMS-VLP wurden mit 0.1 Volumen 20 % Triton x-100 versetzt.

c) Für die Strukturaufklärung der VLP wurden die Zellen mit [^{14}C]Glucosamin und [^{3}H]Uracil getrennt markiert. Die PNS-VLP wurden auf 4 % Triton x-100 Konzentration gebracht und das gleiche Volumen von 1.44 M NaCl wurde zugefügt.

Die Proben wurden auf die folgenden Dichtegradienten aufgetragen:

CsCl: 0 - 1.3 g CsCl/ml H_2O

Sucrose: 15 - 60 % Sucrose (w/w) in MT (2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7.5).

Die Gradienten wurden eine Stunde bei 35 000 rpm und 5°C im Spinco SW 40 Rotor zentrifugiert. Anschließend wurden sie durch eine peristaltische Pumpe des Typs Perpex (LKB, Schweden) bei 40 ml pro Stunde Durchlaufgeschwindigkeit gezapft. Es wurden 8 Tropfen pro Fraktion gesammelt.

Der Refraktionsindex von jeder vierten Fraktion wurde in einem Zeiss Refraktionsmeter gemessen. Die Fraktionen wurden mit BSA (10 µg) gemischt und mit 5 % TCA gefällt. Der Niederschlag wurde durch Cellulosenitrat-Membranfilter von Porengröße 0.45 µ abgesaugt und zweimal mit je 10 ml 5 % TCA gewaschen. Anschließend wurden die Filter getrocknet und die Radioaktivität gezählt.

2.13. Exponentielle Sucrose-Gradienten von Ribosomen

5.9 % Sucrose (w/w)
39.9 % Sucrose (w/w) { in 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7.5.

Die exponentiellen Sucrose-Gradienten wurden nach dem Verfahren von Noll (50) hergestellt.

Die Ribosomen wurden in folgender Kombination auf die Gradienten aufgetragen:

a) cytoplasmatische [^{32}P]Ribosomen aus 4 Tage gewachsenen abnormal-3 Zellen + E.coli [^{3}H]Ribosomen
b) mitochondriale [^{32}P]Ribosomen aus 4 Tage gewachsenen abnormal-3 Zellen + E.coli [^{3}H]Ribosomen
c) mitochondriale [^{14}C]Ribosomen aus 2 Tage gewachsenen abnormal-3 Zellen + mitochondriale [^{3}H]Ribosomen aus Wildtyp-Zellen.

Die Laufzeit der Gradienten betrug 5 Stunden bei 35 000 rpm und 4°C im Spinco SW 40 Rotor. Die Gradienten wurden durch eine peristaltische Pumpe des Typs Perpex (LKB, Schweden) in 4 Tropfen pro Fraktion geerntet und TCA unlösliche Radioaktivität gezählt.

2.14. Zeitlicher Verlauf der RNase Abbau-Reaktion von VLP-RNA

Die Empfindlichkeit der [^{32}P]-markierten VLP-RNA gegen RNase A und T_1 wurde vor und nach der Aufreinigungsprozedur nach verschiedenen Zeiten verfolgt. Der RNase Abbau-Test wurde in verschiedenen Salzkonzentrationen durchgeführt, nämlich

1. in 0.1 x SSC und

2. in 2 x SSC

Der Testansatz enthielt ~50 µg RNA/ml in 0.1 bzw. 2 x SSC und 2 µg RNase A + 10 IU RNase T_1/ml. Es wurden Aliquots vor (0-Wert) und nach der Zugabe von RNase A + T_1 (2, 5, 10, 20 und 30 Minuten) entnommen, mit 1 ml (100 µg/ml) BSA und 1 ml 10 % TCA gemischt, 30 Minuten im Eis stehengelassen und anschließend durch Membranfilter abgesaugt und für die Zählung der TCA unlöslichen Radioaktivität in der üblichen Weise weiterbehandelt.

2.15. Alkalischer Abbau von VLP-RNA

Die aufgereinigte [^{32}P]-markierte VLP-RNA in 0.1 x SSC wurde mit 0.3 N KOH ca. 15 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend TCA fällbare Radioaktivität gemessen.

2.16. DNase Behandlung von VLP-RNA

Die aufgereinigte [^{32}P]-markierte VLP-RNA in MT (2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) wurde mit 0.1 Volumen (1 mg/ml) RNase-freier DNase 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend TCA fällbare Radioaktivität gemessen.

2.17. Bestimmung der Basenzusammensetzung von VLP-RNA

0.5 A_{260}-Einheiten VLP-RNA wurde in 20 µl 0.25 $MgCl_2$, 0.25 M NH_4-Acetat mit

5 µg SVD und 5 µg alkalischer Phosphatase 4 Stunden bei 45°C inkubiert. Die durch die Wirkung von Phosphatase entstandenen Nucleoside wurden in den Nucleosid-Analysator injiziert. Der Nucleosid-Analysator wurde nach Uziel et al. (51) in diesem Institut gebaut. Eine Säule aus Beckman M71 Ionenaustauscher wurde benutzt. Die Elution erfolgte bei 5O°C mit O.4 M NH_4-Format pH 4.65 (52). Die konstante Durchflußgeschwindigkeit wurde mit Dosapro-Milton-Roy Mikropumpen kontrolliert. Es wurde gleichzeitig Absorption bei 26O µm und 28O µm verfolgt.

2.18. Exponentielle Sucrose-Gradienten von VLP-RNA

5 % Sucrose (w/w)
} in 1O m NaCl, 1O mM Tris-HCl pH 7.5.
32.9 % Sucrose (w/w)

2.18.1. Native RNA

Die [^{32}P]-markierte VLP-RNA wurde auf den exponentiellen Sucrose-Gradienten (5O) aufgetragen. Die Laufzeit des Gradienten betrug 14 Stunden bei 32 OOO rpm und 4°C im Spinco SW 4O Rotor. Nach Beendigung der Laufzeit wurde der Gradient in 4 Tropfen pro Fraktion geerntet. Um die konstante Durchflußgeschwindigkeit zu erreichen, wurde eine peristaltische Pumpe vom Typ Perpex (LKB, Schweden) benutzt.

2.18.2. Thermisch denaturierte RNA

Die [^{32}P]-VLP-RNA wurde 2.5 Minuten bei 8O°C inkubiert, dann sofort in Eiswasser gestellt und anschließend auf den oben beschriebenen exponentiellen

Sucrose-Gradienten geschichtet. Laufzeit: 15 Stunden bei 35 000 rpm und 4°C im Spinco SW 40 Rotor.
Es wurden 4 Tropfen pro Fraktion geerntet und TCA unlösliche Radioaktivität wurde gezählt.

2.19. Gel-Elektrophorese von VLP-RNA

Die VLP-RNA wurde in 2.4 % Polyacrylamid-Gelen elektrophorisiert (53). Als Standard diente E.coli-rRNA. Die Polymerisation der Gele wurde in Plexiglasröhrchen vom inneren Durchmesser 0.6 cm und einer Länge von 12 cm durchgeführt. Zur Herstellung der Gele dienten Stocklösungen von 15 % Acrylamid und 2 % Bisacrylamid und 2 x TSE (40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA pH 7.8). Die Endkonzentration von Bisacrylamid betrug 5 % der Acrylamid-Konzentration in der Polymerisationslösung. Zum Polymerisationszweck dienten ca. 30 µl TEMED und 60 µl der 20 %igen (w/w) Ammonsulfatlösung pro g Acrylamid. Sofort nach der Zugabe der beiden Lösungen wurden 3 ml in die Plexiglasröhrchen einpipettiert und 30 Minuten bei Zimmertemperatur polymerisieren gelassen.

Der Puffer während der Elektrophorese unterscheidet sich durch zusätzliche 0.5 % SDS-Konzentration von dem Puffer TSE, der für die Herstellung der Gele benutzt wurde (54). Die Gele wurden zunächst bei einer Stromstärke von 2 mA pro Gel ca. 30 Minuten präelektrophoresiert. Danach wurde die Probe, welche für die Dichteerhöhung ca. 10 % Glycerin enthielt, zusammen mit Bromphenolblau vorsichtig direkt auf die Gel-Oberfläche geschichtet. Die Elektrophorese wurde ca. 3 Stunden bei Zimmertemperatur und einer Stromstärke von 5 mA pro Gel durchgeführt.

Anschließend wurden die Gele für 2 Stunden in bidestilliertem H_2O gewaschen, dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Gelschneider in 1 mM Scheiben geschnitten. Die einzelnen Scheiben wurden mit 0.5 ml 0.3 M KOH über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend mit 10 ml Aquasol im Tricarb gezählt.

2.2o. Hybridisierung

Für den Hybridisierungszweck wurde die [^{32}P]-VLP-RNA genauso behandelt, wie es bei 2.18.2. beschrieben ist. Es wurden Aliquots von einzelnen Fraktionen gezählt, die Peak-Fraktionen gepoolt und für die Hybridisierung benutzt.

Hybridisierung und kompetitive Hybridisierung wurde nach der Methode von Gillespie und Spiegelman (55) durchgeführt. Das Verfahren ist im folgenden beschrieben.

Alkalische Denaturierung der mt-DNA erfolgte in 0.01 x SSC Lösung. Es wurde so lange 6 M KOH zugefügt, bis pH 13 erreicht war. Anschließend wurde sie mit 6 M HCl auf pH 7 zurücktitriert und 30 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wurde die Konzentration mit 20 x SSC und 1 M $MgCl_2$ Lösung auf 6 x SSC und 2.5 mM $MgCl_2$ eingestellt (0.6 ml 20 x SSC und 5 µl 1 M $MgCl_2$/2 ml d.h. das Volumen das pro Filter aufzutragen war) und 1/100 Volumen 1 M KOH zugefügt.

Die Membranfilter von Schleicher & Schüll BA 85, 24 mm Ø und 45 µm Porengröße wurden über Nacht bei 37°C in 6 x SSC eingeweicht und anschließend mit 10 ml dieser Lösung gewaschen. 2 ml der alkalisch-denaturierten DNA-Lösung wurden pro Filter (1 µg DNA/2 ml) aufgetragen und über eine Glasfritte filtriert. Anschließend wurden die Filter unter Vakuum mit 100 ml 6 x SSC gewaschen. Die beladenen DNA-Filter wurden erst über Nacht bei Zimmertemperatur

getrocknet und dann 2 Stunden im Vakuum bei 80°C erhitzt.

Die Hybridisierung zwischen [^{32}P]-VLP-RNA und mt-DNA von Neurospora crassa Wildtyp wurde in 8 x SSC-Lösung durchgeführt, die 50 % Formamid und 0.5 % SDS enthielt. Der Hybridisierungsansatz wurde folgendermaßen hergestellt:

20 x SSC	- 1.6 ml
H_2O	- 0.4 ml
Formamid	- 2.0 ml
SDS	- 0.02 g
Gesamtvolumen	- 4 ml

4 ml dieser Hybridisierungslösung wurden in ein Tricarb-Gläschen eingefüllt und die [^{32}P]-VLP-RNA einpipettiert. Als Blank wurde ein eingeweichter, jedoch unbeschichteter Membranfilter und dann der DNA-Filter in das Gläschen hineingelegt. Der beschichtete DNA-Filter und der Blank waren durch einen Glas-Ring voneinander getrennt. Das Gläschen wurde geschlossen und 15 Stunden bei 40°C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Filter aus der Lösung genommen, vorsichtig in 2 x SSC dreimal gewaschen und einzeln in 4 ml 2 x SSC-Lösung überführt, die 10 µl RNase A (10 mg/ml) enthielt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurden die Filter entnommen, dreimal in 2 x SSC gewaschen und nochmals in 4 ml 2 x SSC + 10 µl RNase-Lösung überführt. Der Inkubations- und Waschvorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden die Filter von jeder Seite mit 50 ml 2 x SSC auf der Glasfritte gewaschen, getrocknet und im Tricarb gezählt.

Für die kompetitive Hybridisierung wurde das oben beschriebene Verfahren verwendet. In diesem Fall enthielt der Hybridisierungsansatz außer der [^{32}P]-VLP-RNA einen Überschuß an kalter totaler mt-RNA bzw. kalter mt-rRNA aus Neurospora crassa Wildtyp.

2.21. Radiojodierung von VLP

PBS-Salin in 0.0 5 M Phosphatpuffer pH 7.2.

a) VLP (2 mg Protein/ml) wurden mit 1 % SDS lysiert und über Nacht gegen PBS dialysiert.

b) Intakte VLP (2 mg Protein/ml) in PBS.

c) Kontrolle.

Die Methode ist bei Stanely und Haslam (56) beschrieben. Zu 50 µl VLP (100 µg Protein) wurden 1 µl Lactoperoxidase (1 mg/ml) und 1 µl [^{125}I] (1 mCi/ml in 5.5 x 10^{-5} M NaI) zugefügt. Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von 1 µl 8.8 mM H_2O_2 in PBS. Die Lösung wurde gut gemischt und die Reaktion bei Zimmertemperatur 30 Minuten laufengelassen. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 350 µl 5 mM Cysteinhydrochlorid in PBS.

Die Kontrolle enthielt gleiche Mengen aller Reagenzien, nur fehlte hierbei Lactoperoxidase.

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Proben im einzelnen über eine Sephadex G-200 Säule analysiert.

2.22. Translation der VLP-RNA in Oozyten

Injektionspuffer: 88 mM NaCl, 1.0 mM KCl, 15 mM Tris-HCl pH 7.6

Inkubationspuffer: (pro Liter) 4.64 g NaCl, 76 mg KCl, 70 mg $Ca(NO_3)_2$, 44 mg $CaCl_2$, 198 mg $MgSO_4$, 200 mg $NaHCO_3$ und 0.242 g Tris-HCl pH 7.6.

Zur Erreichung der Reife von Oozyten wurden die Frösche etwa 15 - 20 Stunden vor der Injizierung intramuskulär mit 1000 IU von HCG injiziert. Der Frosch wurde zur Anaethetisierung in eine Lösung von 1 g/l Sandoz MS-222 gelegt. Die thermisch-denaturierte VLP-RNA wurde lyophilisiert und anschließend konzentriert im Injektionspuffer gelöst (~100 OD/ml) und 50 nl der Lösung wurden in jede von 10 - 15 Oozyten von Xenopus laevis injiziert (57).

Nach der Injizierung von VLP-RNA wurden die Oozyten in 0.5 ml des Inkubationsmediums, das 250 µCi [^{3}H]Leucin enthielt, 15 Stunden bei 20°C inkubiert.

Als Kontrolle dienten die Oozyten, die statt VLP-RNA mit Salin injiziert wurden.

Die Oozyten wurden nach Beendigung der Inkubationszeit mit einer Spritze homogenisiert, das Homogenat 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und die Translationsprodukte über eine Sephadex G-100 Säule getrennt.

2.23. Sephadex-Säulen-Chromatographie

Sephadex G-200 bzw. G-100 Säulen wurden mit 0.5 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.4 haltigem Puffer equilibriert.

Für die Abtrennung der VLP-Proteine wurde stets eine Sephadex G-200 Säule benutzt, während die Analyse des Translationsproduktes von VLP-RNA über Sephadex G-100 erfolgte.

Es wurden 0.5 ml von jeder zweiten Fraktion mit 10 ml Aquasol gemischt und im Tricarb gezählt.

2.24. Chemische Bestimmungen und sonstige Methoden

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Lowry et al. (49). Die Bestimmung von RNA wurde nach dem Orcinol-Verfahren (58) durchgeführt. D-(-) Arabinose wurde als Standard benutzt. Die Kohlenhydrate wurden nach der Anthrone-Methode (59) bestimmt.

Die Messung vom RNA-Spektrum wurde im UNICAM SP 1800 Ultraviolett-Spektralphotometer durchgeführt.

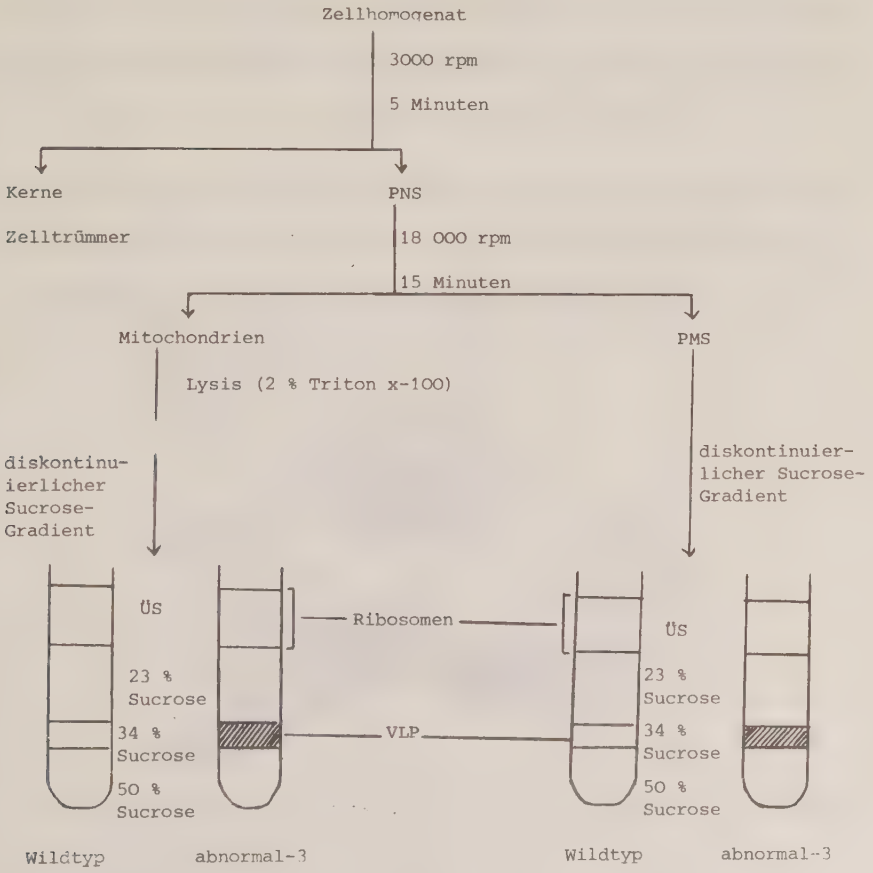
Die Szintillationsflüssigkeit wurde wie folgt zusammengesetzt: 8 g PPO plus 0.2 g POPOP, aufgefüllt mit Toluol auf 2 l.

Die Messungen wurden durchgeführt im Packard Tricarb Modell 3375 und 2425.

3. ERGEBNISSE

3.1. Zellfraktionierung und Isolierung der VLP

Die folgende schematische Darstellung gibt einen Überblick über das differentiale Zentrifugationsverfahren zur Zellfraktionierung von Wildtyp und "abnormal-3"-Mutante von Neurospora.



Die VLP von abnormal-3 bilden eine gut erkennbare Bande, die in den Wildtypzellen nicht nachweisbar ist. Ungefähr 40 % der gesamten isolierten VLP lassen sich durch die erste differentiale Zentrifugation von Mitochondrien abtrennen. Weitere 20 % können mit EDTA-haltigem Puffer von Mitochondrien ausgewaschen werden. Die restlichen 40 % werden durch Behandlung der Mitochondiren mit dem Detergenz Triton x-100 freigesetzt. Es waren keine strukturellen Unterschiede zwischen "cytoplasmatischen" aus PMS isolierten VLP und aus Mitochondrien durch Triton x-100 freigesetzten VLP festzustellen. Dieses weist darauf hin, daß Triton x-100 offenbar die morphologische und strukturelle Integrität der VLP nicht beeinträchtigt.

Figur 1 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme von Ultradünnschnitten aufgereinigter VLP nach OsO_4-Fixierung. Es sind polymorphe Vesikel zu sehen, die ein elektronendichtes Nucleoid von 120 - 170 nm Durchmesser enthalten.

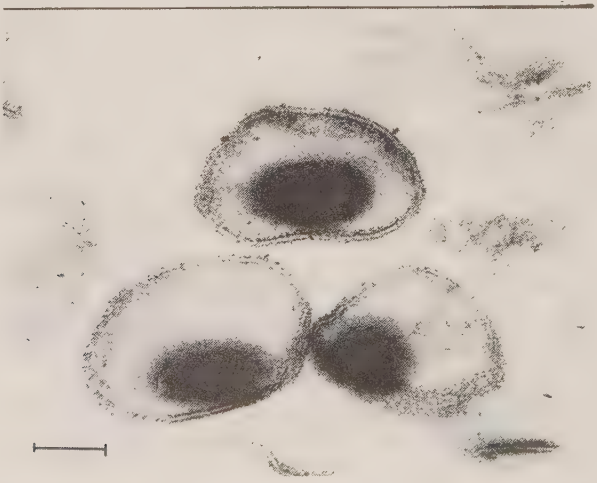


Fig. 1: Ultradünnschnitt von aufgereinigter VLP nach OsO_4-Fixierung und Kontrastfärbung mit Uranylacetat. Die Strecke entspricht 100 nm.

Dieser "Core" ist von einer oder manchmal mehreren Membranhüllen ("Envelops") umschlossen.

3.2. Wachstumscharakteristika von abnormal-3

Langsames Wachstum ist eines der Charakteristika der Mutante abnormal-3. Erst nach 4 Tagen ist die stationäre Phase erreicht (Fig. 2). Die Ausbeute beträgt etwa 25 g Hyphenfeuchtgewicht/l Nährmedium. Die Ergebnisse in Fig. 2 - 6 sind von mindestens 3 Bestimmungen gewonnen worden.

Typisch für abnormal-3 ist die Produktion von VLP, die sich mit Beginn der stationären Phase verstärkt. Es scheint im allgemeinen einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der VLP-Produktion von Pilzen zu geben. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Penicillium chrysogenum wurde mit steigendem

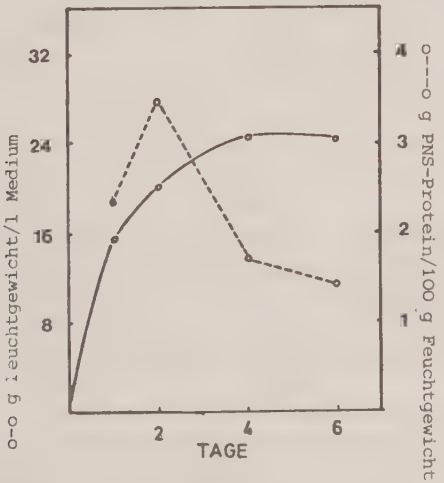


Fig. 2: Wachstumskurve in g Feuchtgewicht/l Medium im Vergleich zum PNS-Proteingehalt (in g/100 g Feuchtgewicht).

Alter der Kultur zunehmende Virus-Vermehrung beobachtet. Dies war gekoppelt mit der gleichzeitigen Abnahme von normalen Zellbestandteilen wie Ribosomen und Mitochondrien (6o).

Es wurden quantitative Bestimmungen von PNS, Mitochondrien, Ribosomen und VLP von abnormal-3 anhand deren Proteingehalt (bezogen auf mg Protein/100 g Hyphen-Feuchtgewicht) durchgeführt. Das Maximum von PNS-Proteinen wurde nach 2 Tagen beobachtet, das in der stationären Phase, d.h. nach 4 und 6 Tagen stark abnimmt (Fig. 2). Das Gleiche gilt für Mitochondrien und für cytoplasmatische und mitochondriale Ribosomen (Fig. 3). Der Gehalt an Ribosomen war nach einem Tag maximal und nahm danach kontinuierlich ab.

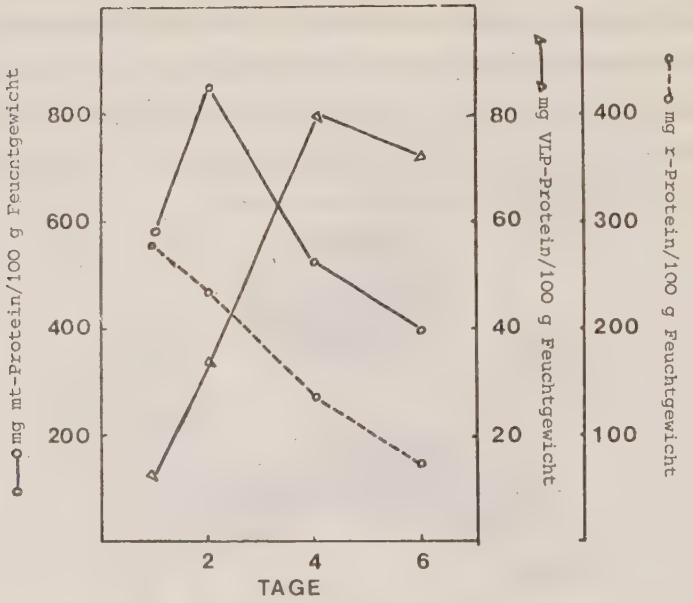


Fig. 3: Proteinbestimmungen von Mitochondrien, Ribosomen und VLP nach verschiedenen Wachstumszeiten berechnet auf 100 g Hyphenfeuchtgewicht.

Im Gegensatz zu PNS-, mitochondrialen und ribosomalen Proteinen nahm der Gehalt an VLP-Proteinen per Zellfeuchtgewicht mit zunehmendem Alter der Hyphen kontinuierlich zu. Das Maximum wurde nach 4 Tagen in der stationären Phase erreicht (Fig. 3).

Bezogen auf PNS-Protein nahm der Gehalt an mitochondrialen Proteinen in der stationären Phase zu (Fig. 4). Dies könnte auf die starke Abnahme der PNS-Proteine pro Zellfeuchtgewicht nach 4 und 6 Tagen zurückzuführen sein. Da

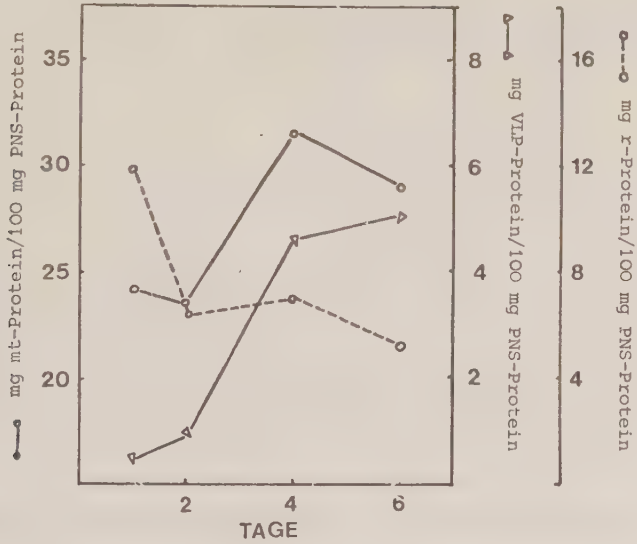


Fig. 4: Proteinbestimmungen von Mitochondrien, Ribosomen und VLP nach verschiedenen Wachstumszeiten berechnet auf 100 mg PNS-Protein.

der Wassergehalt der Zellen, der bei solchen Bestimmungen eine große Rolle spielen könnte, nicht bestimmt wurde, ist dieses Ergebnis schwer zu interpretieren.

Gleichzeitig ist eine Abnahme des Gehalts an ribosomalen Proteinen und eine Zunahme von VLP-Proteinen pro 100 g PNS-Protein zu beobachten (Fig. 4).

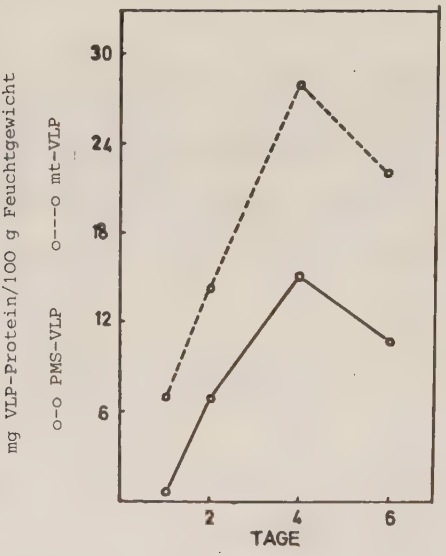


Fig. 5: Proteinbestimmung von PMS bzw. Mito-VLP nach verschiedenen Wachstumszeiten berechnet auf 100 g Hyphenfeuchtgewicht.

Figur 5 zeigt den Gehalt von VLP in Mitochondrien und PMS. In beiden Fällen ist die ständige Zunahme der VLP mit der Wachstumszeit zu beobachten. Das Verhältnis zwischen PMS-VLP und VLP aus Mitochondrien ist nochmals in Figur 6 dargestellt. Die VLP-Produktion im PNS ist am ersten Tag des Wachstums nicht signifikant. Danach beträgt die Menge an PMS-VLP etwa 33 % der gesamten VLP.

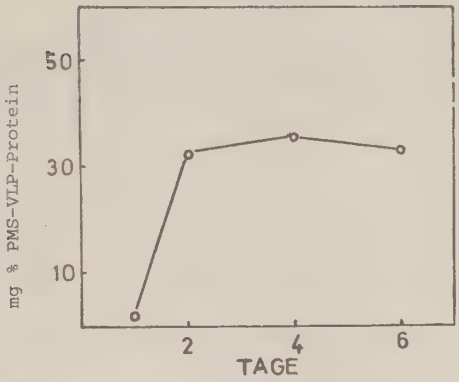


Fig. 6: mg Prozent PMS-VLP-Protein nach verschiedenen Wachstumszeiten.

3.3. Cytoplasmatische und mitochondriale Ribosomen von abnormal

Cytoplasmatische und mitochondriale Ribosomen von abnormal-3 wurden nach einer Modifizierung des Verfahrens von Küntzel (18) isoliert. Da der PMS von abnormal-3 im Gegensatz zum Wildtyp als zusätzliche Fraktion die VLP enthält, müssen VLP vor der Isolierung von cytoplasmatischen und mitochondrialen Ribosomen vom PMS bzw. mitochondrialen Lysat entfernt werden. Dies geschah, indem man PMS bzw. mitochondriales Lysat zunächst auf einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten schichtete. Nach der Abtrennung der VLP wurden die Ribosomen vom Überstand des jeweiligen Gradienten isoliert (siehe Fraktionierungsschema S. 27).

Die cytoplasmatischen bzw. mitochondrialen Ribosomen von abnormal-3 wurden mit E.coli Ribosomen oder mit mitochondrialen Ribosomen im exponentiellen Sucrose-Gradienten verglichen. Figur 7 zeigt ein Profil der cytoplasmatischen [^{32}P]Ribosomen aus 4 Tage alten Zellen von abnormal-3. E.coli [^{3}H]Ribosomen

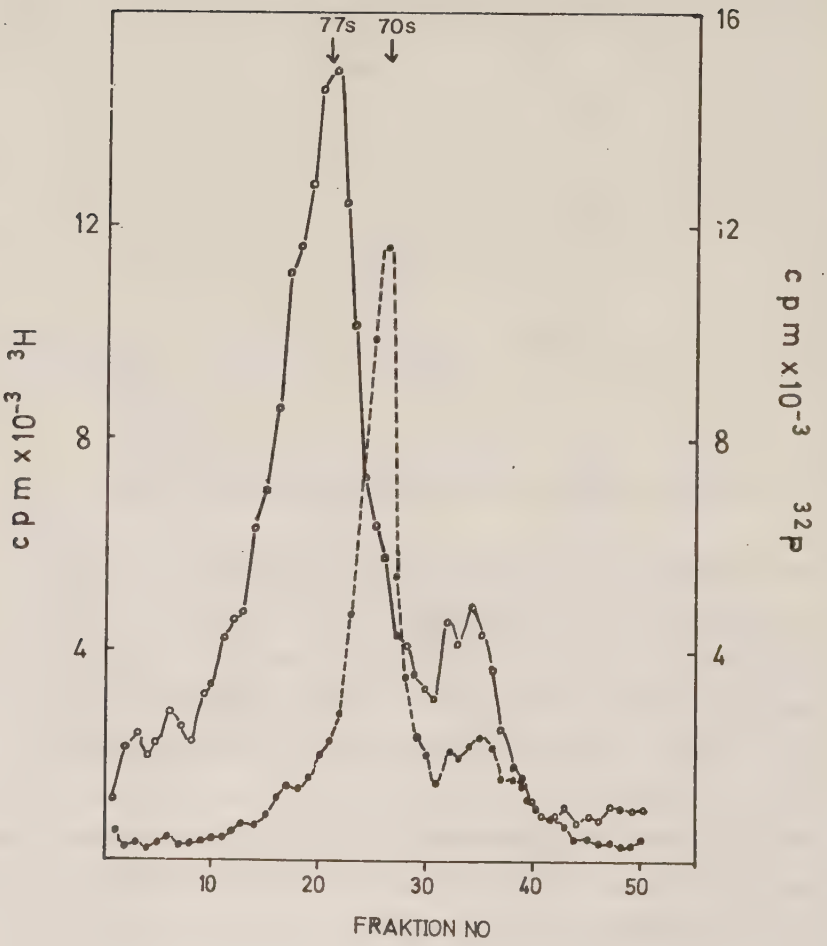


Fig. 7: Exponentielle Sucrose-Gradienten von (o-o) [^{32}P] cytoplasmatischen Ribosomen aus 4 Tage gewachsenen abnormal-3 Zellen und (●--●) [^{3}H] E.coli Ribosomen.

dienten als interner Standard. Cytoplasmatische [^{32}P]Ribosomen von abnormal sind schwerer als E.coli [^{3}H]Ribosomen und sedimentieren in der Region von 77 S.

Die mitochondrialen [^{32}P]Ribosomen aus 4 Tage alten Zellen wurden ebenfalls mit E.coli [^{3}H]Ribosomen als internem Marker verglichen (Fig. 8). Der Hauptpeak der mitochondrialen Ribosomen sedimendiert eindeutig schneller als E.coli Ribosomen und auch als cytoplasmatische [^{32}P]Ribosomen (vergl. Fig. 7) mit einer Schulter in der Region zwischen cytoplasmatischen Ribosomen und E.coli Ribosomen.

Da aus den Versuchen zur Bestimmung der Wachstumscharakteristika hervorgegangen ist, daß sowohl die Morphologie der Kultur als auch die charakteristische VLP-Produktion bei den 2 Tage alten Zellen nicht so ausgeprägt ist wie bei den 4 Tage alten Zellen, wurde beschlossen, die Zellen nach der 2-tägigen Wachstumszeit auf mitochondriale Ribosomen zu untersuchen.

Es wurde ein Gemisch von mitochondrialen Ribosomen aus 2 Tage alten abnormal-3 Zellen und mitochondrialen [^{3}H]Ribosomen aus Wildtyp-Zellen im exponentiellen Sucrose-Gradienten zentrifugiert (Fig. 9). Es ist deutlich, daß die Schulter, die bei den mitochondrialen Ribosomen aus 4 Tage alten Zellen auftrat, hier als ein klarer Peak mit 73 S mitochondrialen Ribosomen aus Wildtyp sedimentiert. Jedoch erscheint auch hier ein Hauptteil der mitochondrialen Ribosomen in der Region von 80 S.

Inzwischen wurde gezeigt, daß man auch aus Wildtyp von Neurospora je nach Aufarbeitungsbedingungen 73 S oder 80 S Ribosomen aus Mitochondrien isolieren kann, wobei die 80 S-Form als native Ribosomen angesehen wird (61).

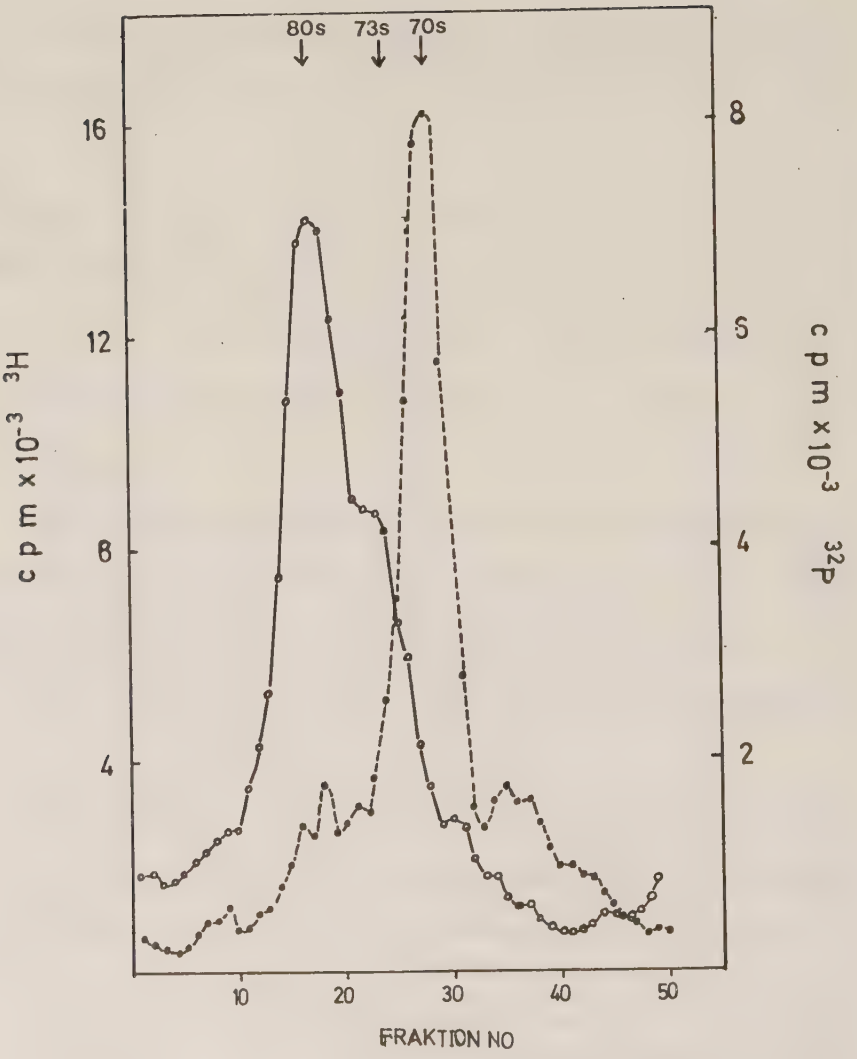


Fig. 8: Exponentielle Sucrose-Gradienten von (o-o) [^{32}P] mitochondrialen Ribosomen aus 4 Tage gewachsenen abnormal-3 Zellen und (●--●) [^{3}H] E.coli Ribosomen.

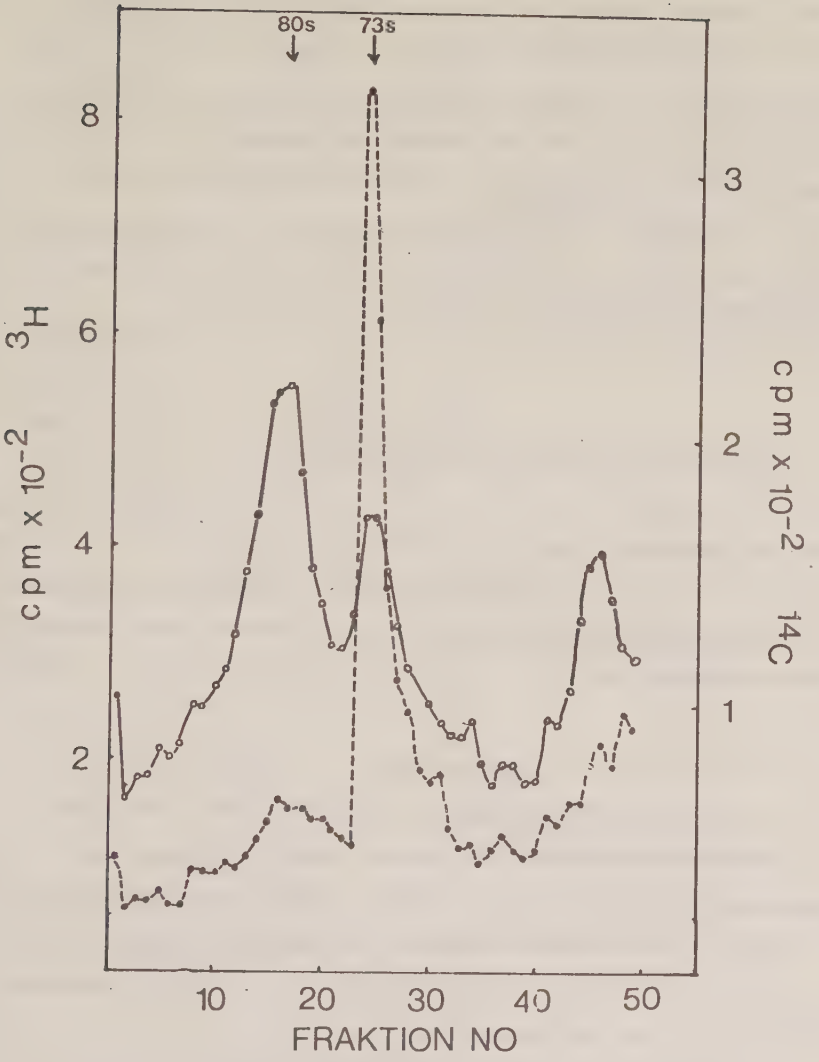


Fig. 9: Exponentielle Sucrose-Gradienten von (o-o) [^{14}C] mitochondrialen Ribosomen aus 2 Tage gewachsenen abnormal-3 Zellen und (●--●) [^{3}H] mitochondrialen Ribosomen von Wildtyp.

Nach 2-tägigem Wachstum, d.h. in relativ jungen Kulturen von abnormal-3, in denen sich die VLP-Produktion noch im Anfangsstadium befindet, sind sowohl 80 S- als auch 73 S-Ribosomen zu beobachten. Nach 4-tägiger Wachstumszeit, wo die VLP-Vermehrung mehr oder weniger ihren Höhepunkt erreicht hat, liegen die mitochondrialen Ribosomen fast ausschließlich in der aktiven 80 S-Form vor. Dies weist auf die erhöhte Protein-synthetisierende Aktivität der mitochondrialen Ribosomen hin in einer Phase des Zellzyklus, wo VLP in grossen Mengen produziert werden.

3.4. Struktur und chemische Zusammensetzung der VLP

Aus der chemischen Analyse der VLP geht hervor, daß sie sich aus 4 - 6 % RNA, 83 - 85 % Proteinen, 4 % Kohlenhydraten und 7 % Phospholipiden zusammensetzen. 7 % des gesamten Trockengewichts der aufgereinigten VLP sind als Phospholipide extrahierbar.

In Tabelle I ist die Phospholipid-Analyse von VLP zusammengefaßt und mit der von mitochondrialen Membranen verglichen. VLP besitzen einen hohen Cardiolipingehalt; ein Phospholipid, das in Bakterien vorkommt und in eukaryotischen Zellen ausschließlich in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist (62). Verglichen mit beiden mitochondrialen Membranen enthalten VLP niedrige Phosphatidylcholin-Konzentration, aber ungewöhnlich hohe Phosphatitdylethanolamin-Konzentration.

Die VLP haben eine einfache Protein-Zusammensetzung. Die in vivo mit [^{14}C] Leucin oder [^{3}H]Glucosamin markierten VLP-Proteine wurden durch Sephadex G-200 nach ihren Molgewichten getrennt. Als Eich-Proteine wurden BSA und

Cyt. c zugefügt.

Tabelle I: Phospholipid-Zusammensetzung[+] von VLP und mitochondrialen Membranen.[++]

Phospholipide	VLP	Mitochondrien	
		Innere Membran	Äußere Membran
Phosphatidylethanolamin	67.5	35	31
Cardiolipin	9.8	21	3
Phosphatidylinositol	1.8	2	17
Phosphatidylserin	9.1		
Phosphatdiylcholin	11.8	41	49

[+] ausgedrückt in Prozent totaler Phospholipide

[++] Die Werte sind von Rattenleber-Mitochondrien (62). Die mitochondrialen Membrane haben jedoch identische Phospholipid-Zusammensetzung (W. Neupert, pers. Mitteilung).

Das Elutionsprofil von [^{14}C]Leucin-markierten VLP (Fig. 10A) zeigt zwei Protein-Komponenten mit Molekulargewichten von 15 000 (Protein 1) und 95 000 (Protein 2). Wenn aber mit [^{3}H]Glucosamin markiert wurde, inkorporierten VLP die Radioaktivität fast ausschließlich im Protein 2 vom Molekulargewicht 95 000.

Die mit [^{3}H]Leucin oder [^{32}P]Na-Phosphat markierten VLP wurden mit 90 % Methanol extrahiert und durch Sephadex 200 G Filtration analysiert (Fig. 10B). Es zeigte sich, daß nur Protein 1 extrahiert wurde.

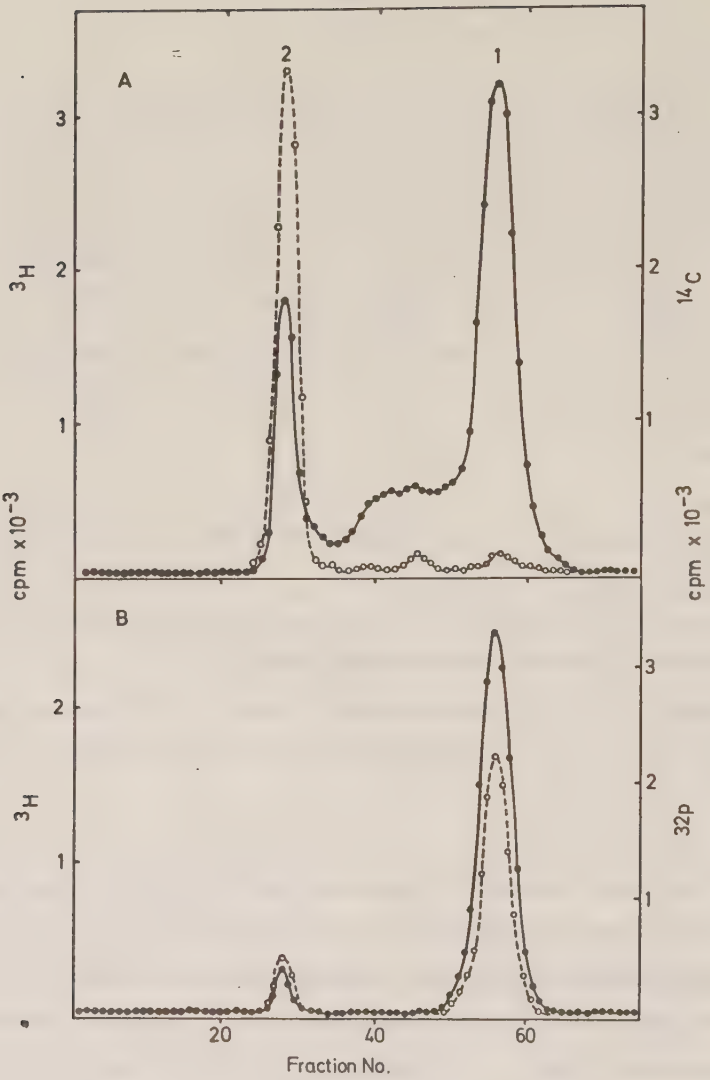


Fig. 10: Gelfiltration von VLP-Proteinen in Gegenwart von SDS. Die Markierung von VLP ist unter 'Methoden' beschrieben. Die VLP sind mit 1 %igem SDS lysiert und durch Sephadex G-200 filtriert. (A) mit [^{14}C] Leucin (●-●) oder [^{3}H]Glucosamin (o--o) markierte VLP-Proteine. (B) mit [^{32}P]Na-Phosphat (o--o) oder [^{3}H]Leucin (●-●) markierte und Methanol-lösliche VLP-Proteine.

Daraus kann geschlossen werden, daß VLP als Hauptkomponenten ein Lipoprotein vom Molekulargewicht 15 000 und ein Glykoprotein vom Molekulargewicht 15 000 enthalten, wobei das Lipoprotein überwiegt.

3.4.1. Gleichgewicht-Dichte-Gradienten-Zentrifugation der VLP

Die Gleichgewicht-Dichte-Gradienten-Zentrifugation der VLP wurde im linearen CsCl- und Sucrose-Gradienten durchgeführt. Im Sucrose-Gradienten bilden die VLP eine Bande bei der Dichte von 1.20 - 1.21 g/cm^3 (Fig. 11), während im

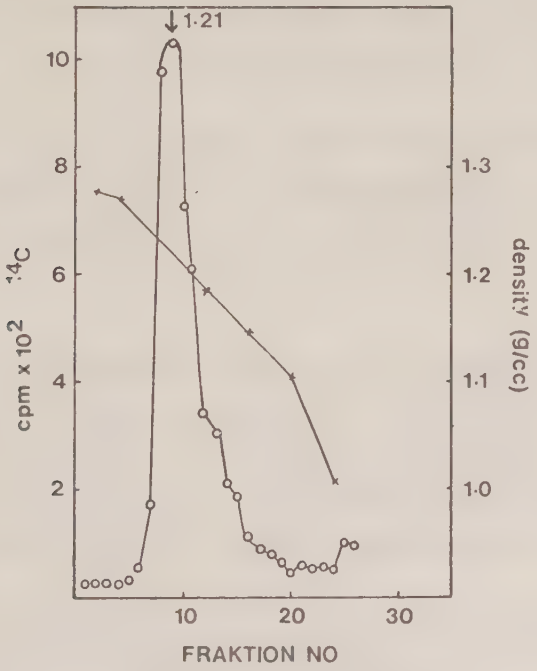


Fig. 11: Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation von [^{14}C]Leucin-markierten VLP.

CsCl-Gradienten die Dichte 1.28 g/cm^3 beträgt (Fig. 12A).

Die Schwebedichte von VLP im CsCl-Gradienten (1.28 g/cm^3) ist um fast 100 mg höher als die von RNA-Tumorviren (1.18 - 1.2), die eine ähnliche Struktur aufweisen (63).

Es war nicht nötig, vor der Zentrifugation im CsCl-Gradienten die VLP mit Formaldehyd zu fixieren (64). Dies weist darauf hin, daß Nucleinsäure-Protein- bzw. Protein-Protein-Bindungen der VLP recht stabil sind und hohe Salzkonzentration aushalten können.

Es wurde eine scharfe weißliche Bande im Sucrose- und CsCl-Gradienten beobachtet, die ein Absorptionsmaximum bei 230 µm besaß. Diese Bande beruht höchstwahrscheinlich auf Polysacchariden, die stets mit der RNA extrahiert werden (siehe 3.4.3.).

Die Schwebedichte von VLP bleibt unverändert, wenn diese bei einer Protein-Konzentration von 2 mg/ml mit 2 % Triton x-100 behandelt und anschließend im CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert werden (Fig. 12B). Dies spricht für eine gewisse Resistenz der VLP-Membrane gegen Triton x-100, was auch die Isolierung der VLP aus Mitochondrien durch Triton x-100-Lysis ermöglicht.

Unter Verwendung hoher Salzkonzentration und der neutralen Detergenzien Triton N-101 oder Triton x-100 ist bei verschiedenen Viren wie VSV und NDV die selektive Entfernung der im Envelop lokalisierten Glykoproteine gelungen (65-67).

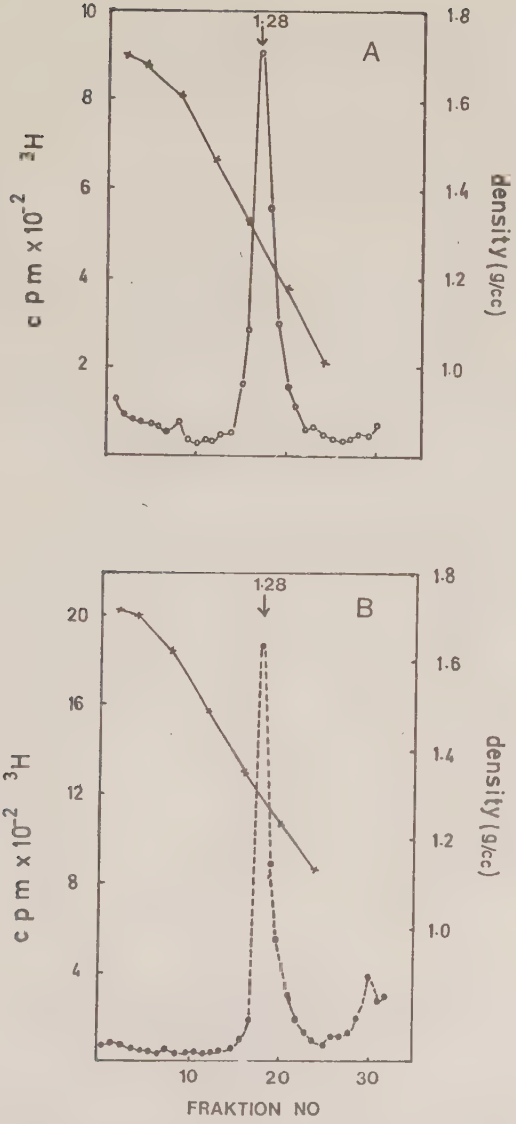


Fig. 12: CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation von VLP. (A) [^{3}H]Uracil-markierte VLP. (B) mit 2 % Triton x-100 behandelte [^{3}H]Uracil-markierte VLP.

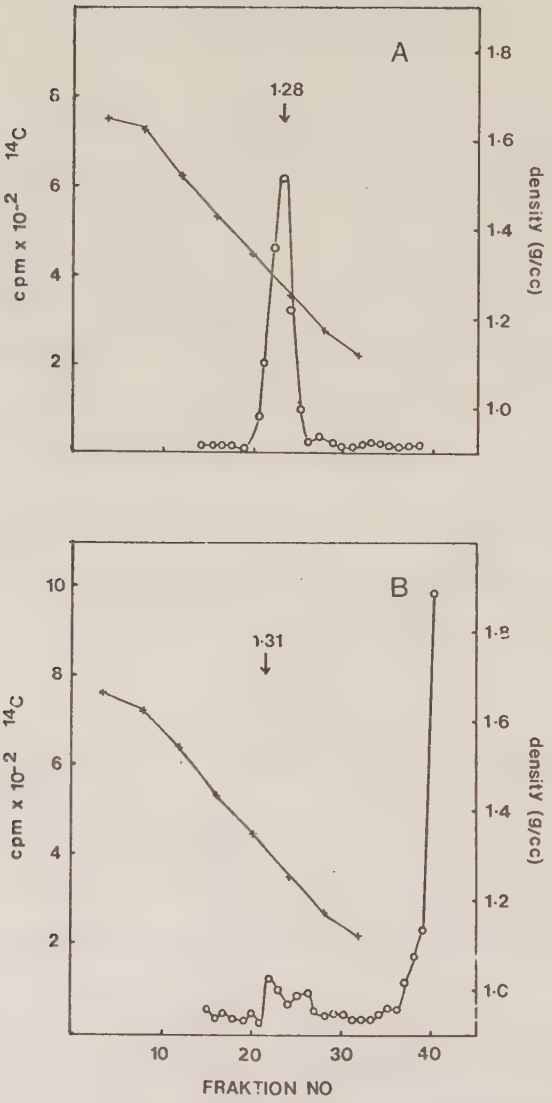


Fig. 13: CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation von VLP. (A) [^{14}C]Glucosamin-markierte intakte VLP. (B) mit 4 % Triton x-100 und 0.72 M NaCl behandelte [^{14}C]Glucosamin-markierte VLP.

Diese Methode wurde für die Envelop-Abtrennung von VLP aus abnormal-3 benutzt. Die VLP wurden auf 4 % Triton x-100 und 0.72 M NaCl Konzentration gebracht und anschließend im CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert.

In Figur 13A und B ist die Zentrifugation von [^{14}C]Glucosamin-markierten VLP vor bzw. nach der Triton x-100-NaCl-Behandlung im CsCl-Dichtegradienten aufgezeichnet. Mit [^{14}C]Glucosamin markierte intakte VLP haben die gleiche Schwebedichte wie die mit [^{3}H]Uracil markierten VLP, nämlich 1.28 g/cm^3 (Fig. 13A). Nach Zugabe von Triton x-100 und NaCl und anschließender Zentrifugation wurde fast 95 % der Radioaktivität freigesetzt. Die restlichen 5 % der Radioaktivität sedimentierten mit einer Dichte von 1.31 g/cm^3.

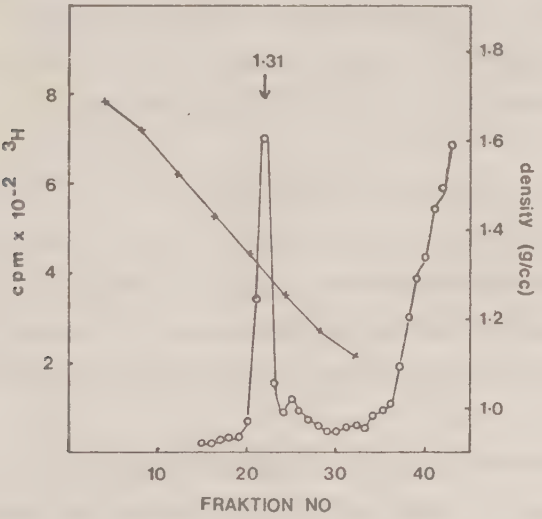


Fig. 14: CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation von [^{3}H]Uracil-markierten VLP. Vor der Zentrifugation wurden die VLP mit 4 % Triton x-100 und 0.72 M NaCl behandelt.

Nach der Detergenz-Salz-Behandlung von VLP, die mit [^{3}H]Uracil markiert waren, änderte sich ebenfalls die Schwebedichte. Ungefähr 60 - 70 % der Radioaktivität war mit den Partikeln verbunden, deren Schwebedichte 1.31 g:cm^3 betrug (Fig. 14). Die etwas höhere Dichte vom Nucleoprotein-Core (1.31 g/cm^3) dürfte auf die Zugänglichkeit der RNA zu Cs-Ionen zurückzuführen sein.

3.4.2. Radio-Jodierung des Envelop-Proteins von VLP durch Lactoperoxidase

Die Jodierung der Tyrosin-Reste der Proteine durch Lactoperoxidase verläuft unter sehr milden Bedingungen und verursacht keinerlei Veränderungen der Protein-Struktur (68). Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß nur die Proteine der äußeren Membran bzw. des Envelops durch Lactoperoxidase jodiert werden, vorausgesetzt, daß Tyrosin-Reste dem Enzym zugänglich sind. Das hohe Molekulargewicht des Enzyms (78 000) verhindert seine Diffusion durch die äußere Membran und damit die Jodierung der inneren Proteine (69).

Zunächst wurde die enzymatische Jodierbarkeit der frei zugänglichen VLP-Proteine getestet. Dazu wurden die VLP mit SDS lysiert und nach Entfernen des SDS durch Dialyse enzymatisch jodiert. Figur 15 zeigt, daß die beiden Proteine (Glyko- und Lipoprotein) im Verhältnis 1 : 7 markiert werden, was etwa dem Verhältnis der frei zugänglichen Tyrosinreste entsprechen sollte.

Wenn die Jodierungsreaktion jedoch an intakten VLP durchgeführt wird, verschiebt sich das Verhältnis der Markierung zugunsten des Glycoproteins auf 1 : 1.8 (Fig. 16).

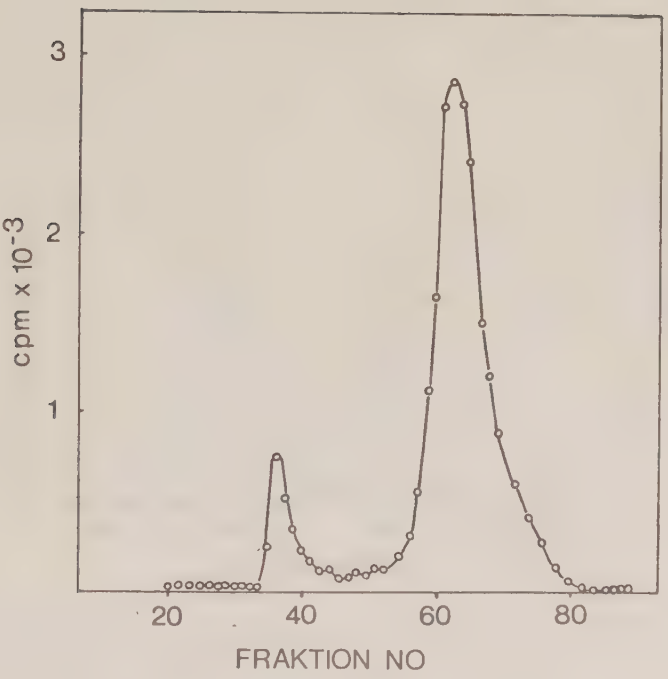


Fig. 15: Gel-Filtration der [^{125}I]-markierten VLP-Proteine über Sephadex G-200. Die VLP wurden mit 1 %igem SDS lysiert, SDS wurde durch Dialyse entfernt und die VLP-Proteine durch Lactoperoxidase jodiert.

Die Kontrolle ohne Enzym zeigt, daß die nichtenzymatische Jodierung vernachlässigbar ist. Dies bedeutet, daß das Glykoprotein für Lactoperoxidase besser zugänglich ist als das Lipoprotein und deshalb vorwiegend oder gar ausschließlich im Envelop lokalisiert sein muß. Ein hundertprozentiger Schutz des Lipoproteins vor enzymatischer Jodierung läßt sich nicht erwarten, weil während der Aufarbeitung der VLP mit Sicherheit ein Teil der Membranvesikel beschädigt wird. Core-Partikel ohne umhüllende Membran wurden in der

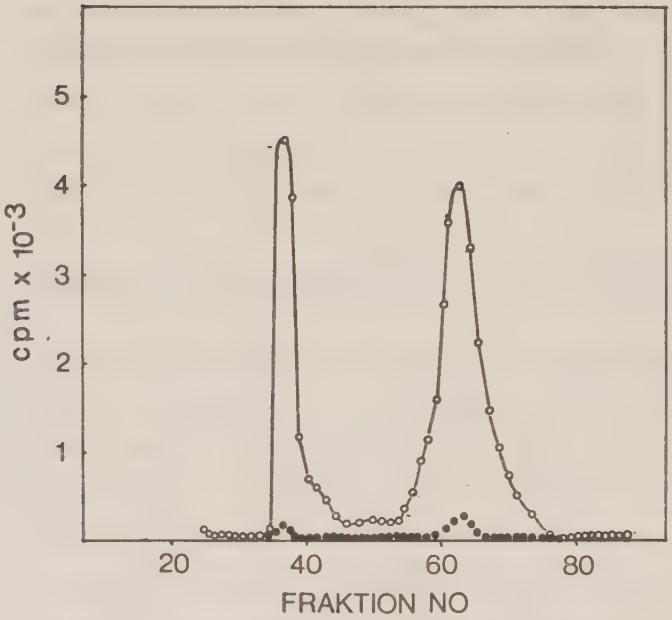


Fig. 16: Gel-Filtration der [^{125}I]-markierten VLP-Proteine über Sephadex G-200.
(o-o) Jodierung der intakten VLP-Proteine durch Lactoperoxidase.
(●-●) Spontane Jodierung der VLP-Proteine ohne Lactoperoxidase.

Tat in Ultradünnschnitten von isolierten VLP gefunden (Kind, persönliche Mitteilung).

3.4.3. Einzelsträngigkeit der VLP-RNA

Die nach der SDS-Phenol-Extrahierung gewonnene VLP-RNA war recht trüb und zeigte ein Absorptionsmaximum bei 230 µm (Fig. 17A). Eine einfache Methode zur Abtrennung der bakteriellen Lipopolysaccharide von RNA ist von Westphal und Jann (48) beschrieben worden.

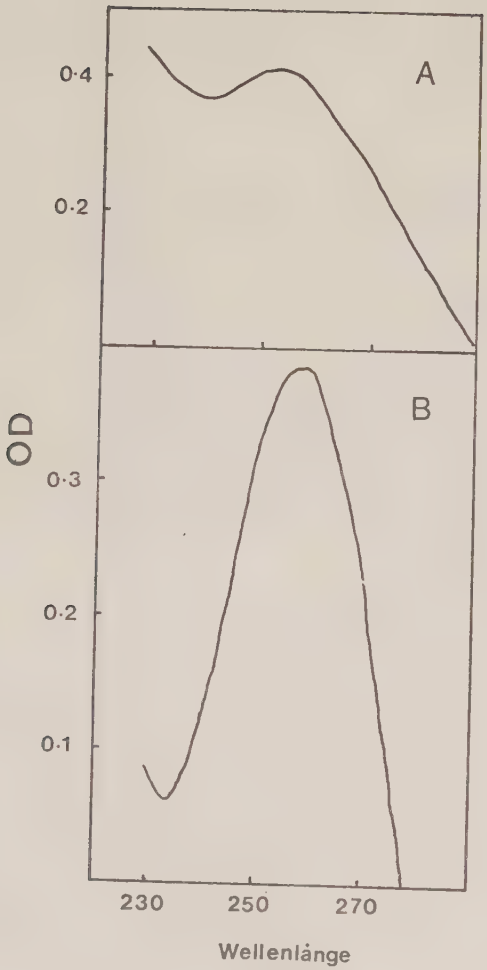


Fig. 17: Absorptionsspektrum der VLP-RNA (A) vor und (B) nach der Aufreinigung.

Die VLP-RNA wurde nach einer Modifizierung dieser Methode 15 Minuten bei 5O OOO rpm im Spinco R 65 Rotor abzentrifugiert. Der klare Überstand enthielt saubere RNA. Das Spektrum nach dem Aufreinigungsschritt zeigt ein Absorptionsmaximum bei 258 µm (Fig. 17B).

Das Pellet wurde in Wasser gelöst und qualitativ auf Polysaccharide nach der Anthron-Methode (59) untersucht. Der Test war stark positiv und bestätigte die Anwesenheit der Polysaccharide als Verunreinigung bei den VLP-Präparationen.

Empfindlichkeit gegen RNase bei der hohen Salzkonzentration ist unter anderem ein Kriterium der Einzelsträngigkeit der RNA (7O), wobei die RNase-Konzentration sehr kritisch ist. Bei hoher Konzentration von RNase wird auch die doppelsträngige RNA gespalten.

Die Kinetik der RNase-Abbau-Reaktion von VLP-RNA wurde in O.1 x SSC und in 2 x SSC verfolgt. Bei einer RNA-Konzentration von ~5O µg/ml betrug die Konzentration der RNase 2 µg/ml + 1O IU RNase T_1/ml. In O.1 x SSC wurde eine etwa über 9O %ige Sapltung sofort erreicht, während in 2 x SSC die Spaltung etwas langsamer verlief, bis etwa 88 % Spaltung erreicht war (Fig. 18A). Vor und nach der Aufreinigung der RNA ist kaum eine Differenz bei dem RNase-Test zu beobachten (Fig. 18A und B). Aufgrund dieser Feststellungen ist die VLP-RNA als einzelsträngig zu betrachten.

Beim alkalischen Abbau-Test stellte sich heraus, daß fast 98 % der RNA Alkaliempfindlich war. Kein DNase-empfindliches Material wurde gefunden. Im RNase-

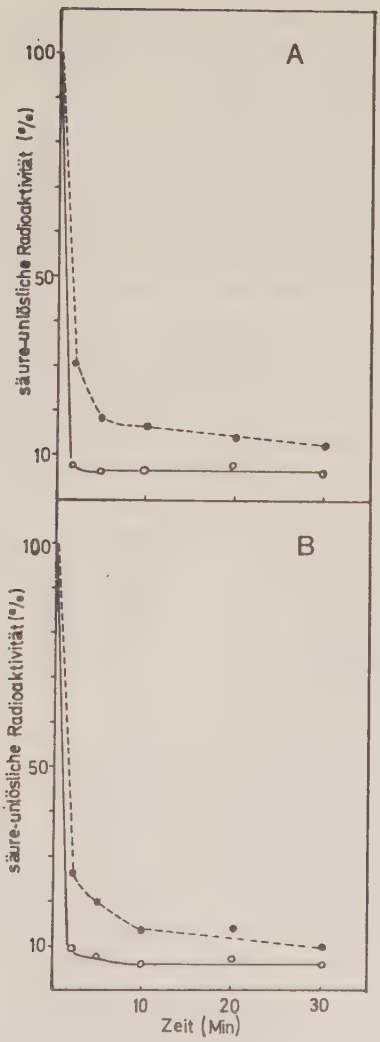


Fig. 18: Zeitlicher Verlauf der RNase-Abbaureaktion von [^{32}P]VLP-RNA in (o-o) 0.1 x SSC und in (●--●) 2 x SSC. Die Reaktion wurde durchgeführt (A) vor der Aufreinigung und (B) nach der Aufreinigung der RNA.

resistenten Anteil der VLP-RNA (10 - 12 %) wurde nach alkalischer Hydrolyse keine erhöhte Menge an AMP gefunden. Dies bestätigt die Abwesenheit sowohl von DNA als auch von Poly-A in VLP-RNA.

Die nicht-komplementäre Struktur der VLP-RNA geht auch aus der Basen-Zusammensetzung hervor. Die Absorption der Nucleoside nach ihrer Trennung über eine Ionenaustauschersäule wurde bei 260 µm/280 nm kontrolliert (Fig. 19).

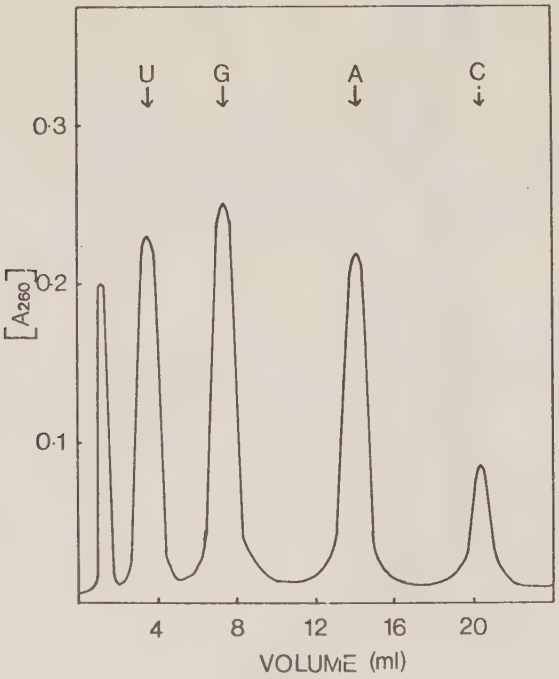


Fig. 19: Absorption bei 260 µm von Nucleosiden der VLP-RNA nach ihrer Trennung über eine Ionenaustauschersäule.

Die numerische Integrierung der Peaks ergab die Menge der Nucleoside im Hydrolysat (52). Modifizierte Nucleoside oder Desoxynucleoside wurden nicht beobachtet. Etwa 10 % der gesamten OD wurden als Verunreinigung im Asschluß eluiert. Dies stimmt sehr gut mit den Ergebnissen des RNase-Tests überein, wobei auch etwa 10 % der gesamten Radioaktivität RNase-resistent ist. Dieser RNase-resistente Anteil stellt höchstwahrscheinlich die Lipopolysaccharide dar, die bei dem Aufreinigungsschritt nicht vollständig abgetrennt werden konnten.

In Tabelle II ist die Basen-Zusammensetzung der VLP-RNA zusammengefaßt und mit der von mitochondrialer und cytoplasmatischer rRNA verglichen. Die VLP-RNA unterscheidet sich demnach deutlich von beiden rRNA-Spezies.

Tabelle II: Basen-Zusammensetzung der VLP-RNA und cytoplasmatischen und mitochondrialen rRNA.

	Mol Prozent				
RNA	A	U	G	C	G+C
VLP	25.1	26.9	29.1	18.9	48.0
Mitochondriale Ribosomen	33.5	31.7	19.5	15.3	34.8
Cytoplasmatische Ribosomen	25.1	24.4	28.8	21.7	50.5

3.4.4. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten von VLP-RNA

Die VLP-RNA wurde im exponentiellen Sucrose-Gradienten analysiert. Im Gegensatz zu linearen Gradienten, bei denen die Sedimentationsgeschwindigkeit von Partikeln mit zunehmender Entfernung vom Rotationszentrum abnimmt, bleibt sie im exponentiellen Gradienten über die gesamte Distanz konstant (50). Es muß

aber immer eine interne Eich-RNA mit bekanntem Sedimentationskoeffizienten benutzt werden.

Die VLP-RNA wurde sofort nach der SDS-Phenol-Extrahierung und Äthanolfällung für die S-Wert-Bestimmung benutzt. Der Aufreinigungsschritt war für diesen Zweck überflüssig, da bei der hohen Geschwindigkeit und der längeren Zeit der Zentrifugation die Verunreinigung automatisch von der RNA abgetrennt wurde.

Figur 20A zeigt das Profil von VLP-RNA im exponenteillen Sucrose-Gradienten. [^{3}H]E.coli rRNA diente als interner Standard. Der Hauptteil der RNA sedimentiert schneller als die beiden E.coli rRNAs mit einem S-Wert von 33. Der Rest der Radioaktivität sedimentiert in der Region von 9 - 4 S.

Es ist außerordentlich schwierig, intakte VLP-RNA zu isolieren. Das verbreitete Vorkommen von Nucleasen in pflanzlichen Zellen im allgemeinen und in Neurospora crassa im besonderen (71) ist bekannt. Über die Degradation von rRNA aus Mitochondrien von Neurospora crassa ist von Küntzel und Noll (21) berichtet worden. Bei manchen VLP-RNA-Präparationen wurden Degradationsprodukte von 28 - 29 S Spezies anstatt 33 S RNA gesehen. Jedoch konnte die VLP-RNA durch rasche Aufarbeitung der VLP und anschließend bei der RNA-Isolierung unter Verwendung des RNase Inhibitors Diethylpyrocarbonat mehrmals annähernd intakt gewonnen werden.

Schmelzen der VLP-RNA bei 80^{o}C verursachte die Umwandlung der gesamten hochmolekularen Spezies in heterogene Spezies mit zwei Hauptpeaks in der Region von 9-7 S (Fig. 20 B).

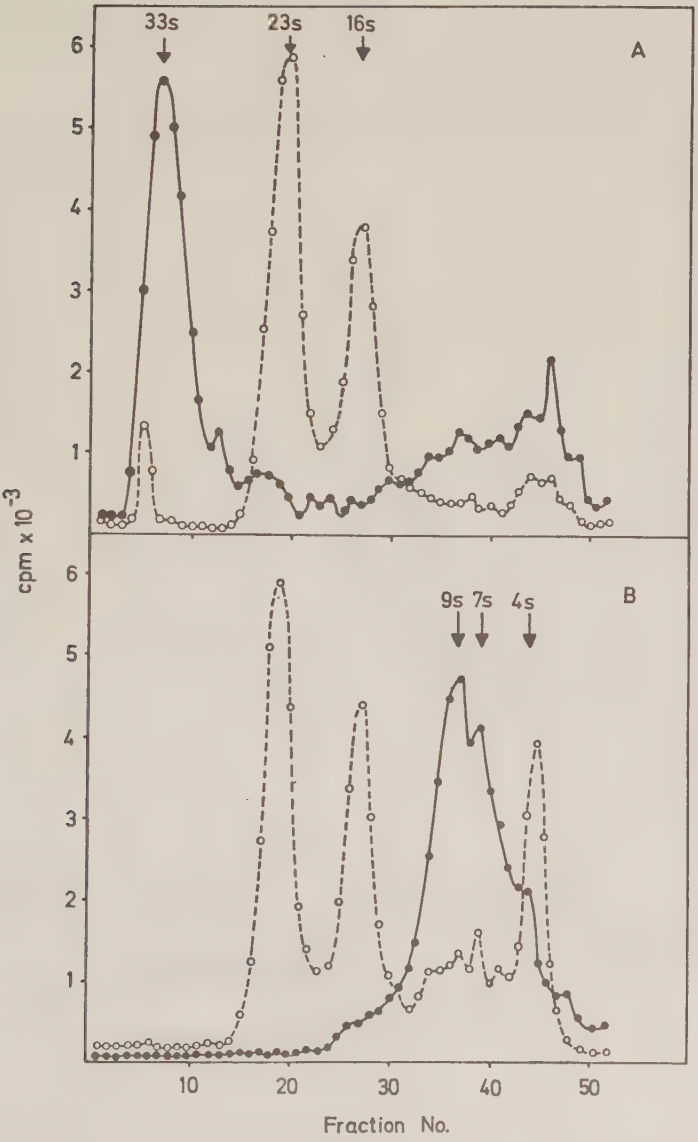


Fig. 2o: Sedimentationsprofil der VLP-RNA im exponentiellen Sucrose-Gradienten. [^{32}P]markierte VLP-RNA wurde gemischt mit [^{3}H]rRNA und [^{14}C]tRNA aus E.coli und entweder direkt zentrifugiert (A) oder nach 2-minütigem Erhitzen bei 80^{o}C (B).

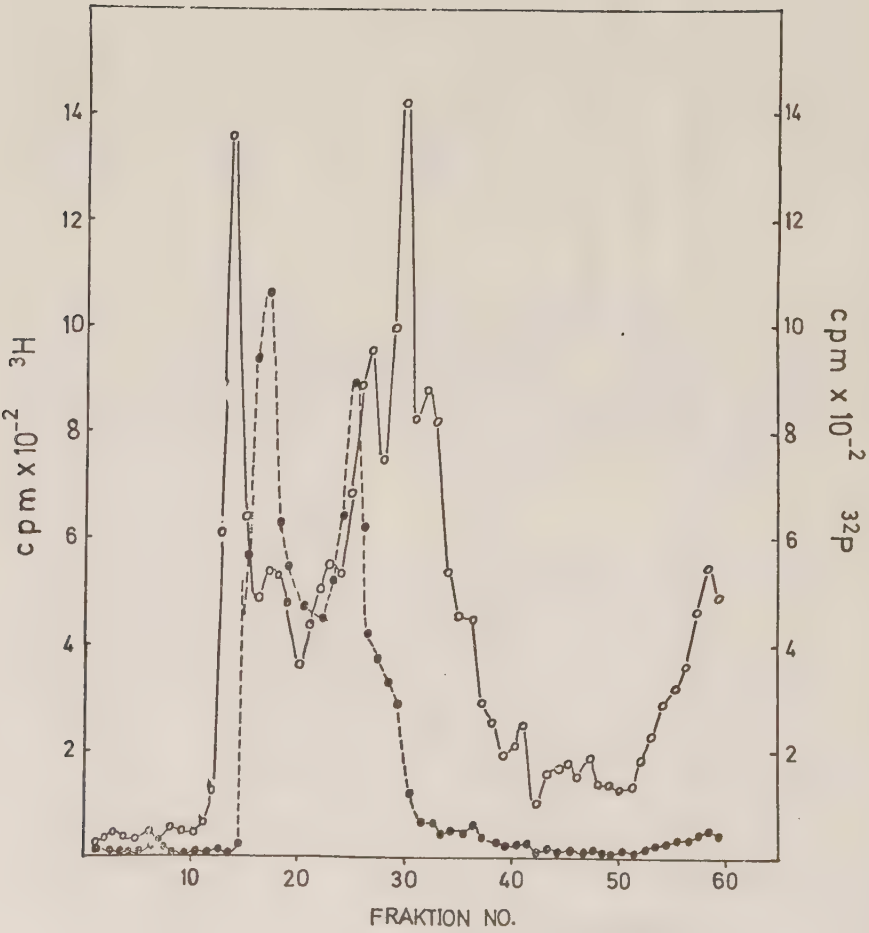


Fig. 21: Elektrophorese der [^{32}P]VLP-RNA (o-o) und [^{3}H]E.coli rRNA (●---●) in 2.4 % Polyacrylamid-Gelen.

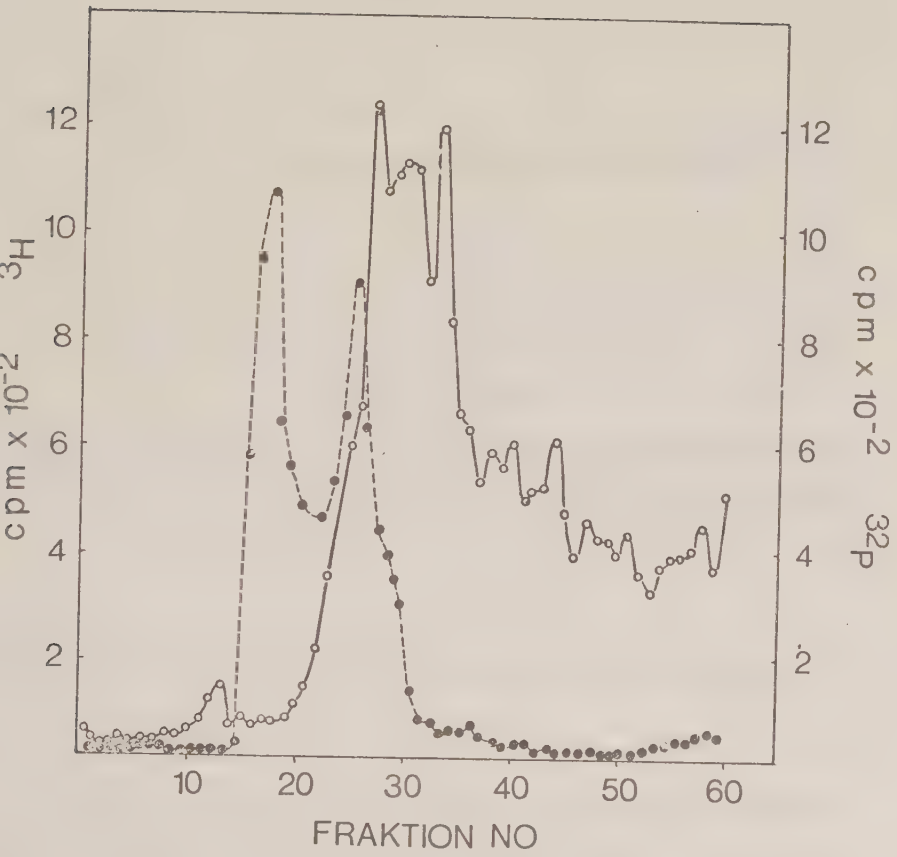


Fig. 22: Elektrophorese der Hitze-denaturierten [^{32}P]VLP-RNA (o-o) und [^{3}H]E.coli rRNA (●---●) in 2.4 % Polyacrylamid-Gelen.

In 2.4 % Polyacrylamid-Gelen wandert die native VLP-RNA eindeutig langsamer als die 23 S E.coli rRNA (Fig. 21). In der Region von 11 - 7 S sind heterogene Spezies zu sehen. Der S-Wert der hochmolekularen Spezies wird auch hier auf etwa 33 geschätzt.

Wie beim exponentiellen Sucrose-Gradienten wandert die hochmolekulare RNA nach der Hitze-Denaturierung in die niedermolekulare Region (Fig. 22).

Daß der niedrige S-Wert der VLP-RNA nicht nur die Konformationsänderung als Folge der thermischen Denaturierung darstellt, sondern tatsächlich durch Disaggregation zustande gekommen ist, geht aus der Wanderungsgeschwindigkeit der VLP-RNA vor und nach Hitzebehandlung hervor. Der Hauptteil der nativen VLP-RNA wandert eindeutig langsamer als die E.coli 23 S RNA in 2.4 % Polyacrylamidgelen. Dies wird nach Disaggregation in heterogene Spezies umgewandelt, die schneller als die kleinere E.coli rRNA wandern.

3.5. Hybridisierung der VLP-RNA mit mitochondrialer DNA aus Neurospora crassa Wildtyp

Denaturierte mitochondriale [^{3}H]DNA aus Neurospora crassa (Wildtyp) wurde auf Membranfiltern (1 µg/Filter) immobilisiert und mit steigenden Mengen von [^{32}P]VLP-RNA (1 - 15 µg) nach der Methode von Gillespie und Spiegelman (55) hybridisiert. Figur 23 zeigt, daß beim 5-fachen Überschuß an VLP-RNA die Sättigung von 4.5 % des mitochondrialen Genoms erreicht wird.

Nach neueren Untersuchungen (72,73) besteht das mitochondriale Genom von Neurospora crassa (Wildtyp) aus einem zirkularen Molekül von ~20 µm Kontur-

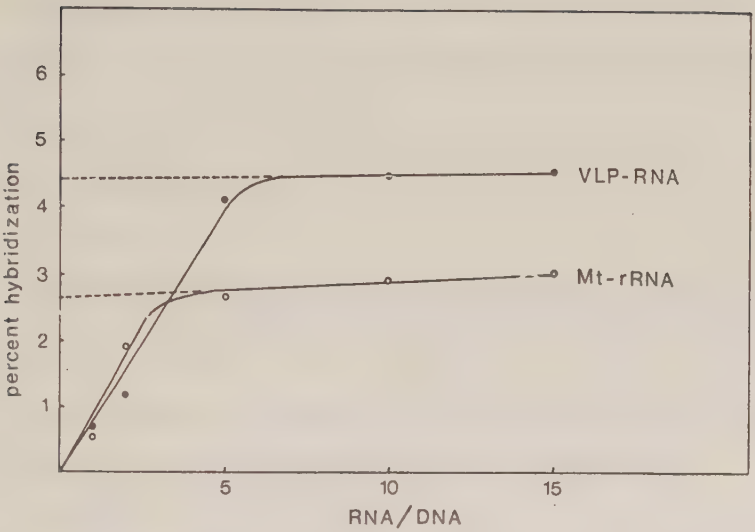


Fig. 23: Hybridisierung von [^{32}P]VLP-RNA und [^{32}P]rRNA aus Wildtyp Mitochondrien mit [^{3}H]mt-DNA von Wildtyp. Die mt-rRNA Daten sind von Schäfer und Küntzel (12).

länge, was einem Molgewicht von ~40 x 10^6 entspricht. Eine 4.5 %ige Sättigung durch VLP-RNA würde dann einem Molgewicht von 1.8 x 10^6 für die 33 S RNA entsprechen.

Die Molgewichtsbestimmung von RNAs ist unter normalen Bedingungen sehr stark von der Konformation und der sekundären Struktur abhängig. Der S-Wert von 33 von VLP-RNA kann nicht für die Molgewichtsbestimmung benutzt werden, da die RNA nicht aus einer einzigen Polynucleotidkette besteht.

Die Hitzedenaturierung verursacht Disaggregation der VLP-RNA in die kleineren 9 - 7 S Ketten. Aus diesen S-Werten der dissoziierten VLP-RNA, d.h. 9 S und 7 S, läßt sich ein Molekulargewicht von 0.2 x 10^{-6} bzw. 0.15 x 10^{-6} abschät-

zen. Das würde bedeuten, daß die 33 S VLP-RNA ein Aggregat von 9 bis 10 kleineren Untereinheiten darstellt.

Die Versuche zur Hybridisierung zwischen VLP-RNA und mt-DNA aus abnormal-3 konnten nicht ausgewertet werden, weil die spezifische Aktivität der [^{3}H]-markierten DNA aus abnormal-3 nicht hoch genug war, um die Verlust der DNA auf dem Filter zu bestimmen. Jedoch wurde eine effektive Hybridisierung zwischen VLP-RNA und mt-DNA aus abnormal-3 beobachtet.

Tabelle III: Hybridisierung zwischen [^{32}P]VLP-RNA und mt-DNA vom Wildtyp in Gegenwart vom 50-fachen Überschuß an verschiedenen Kompetitor-RNAs.

Kompetitor	Prozent Hybridisierung
rRNA von aufgereinigten mt-Ribosomen	97
totale mt-RNA von Zellen der mittleren logarithmischen Phase	53
totale mt-RNA von Zellen der stationären Phase	18
kein Kompetitor	100

In Tabelle III sind die kompetitiven Hybridisierungsdaten verdeutlicht. Die Hybridisierung zwischen 5 µg [^{32}P]VLP-RNA und 1 µg mitochondrialer [^{3}H]DNA aus Wildtyp wurde in Gegenwart von einem 50-fachen Überschuß an kalter rRNA aus Mitochondrien vom Wildtyp durchgeführt. Es wurde keine signifikante Kompetition zwischen der rRNA aus Mitochondrien vom Wildtyp und der [^{32}P]VLP-RNA beobachtet.

Es wurde eine Kompetition von 47 % in Gegenwart vom 50-fachen Überschuß totaler mitochondrialer RNA aus Wildtyp-Zellen beobachtet, die sich in der mittleren logarithmischen Phase befanden, während der 50-fache Überschuß an totaler mitochondrialer RNA aus Wildtyp-Zellen der stationären Phase die Kompetition auf 82 % steigerte.

Diese Daten weisen darauf hin, daß VLP-RNA von einem mitochondrialen Cistron codiert wird, das sich auch im Wildtyp befindet und keine Überlappung mit dem rRNA-Cistron zeigt.

3.6. Translation der VLP-RNA in Oozyten

Um die Frage zu beantworten, ob die VLP-RNA Messenger-Eigenschaften hat, wurde sie nach termischer Denaturierung in Oozyten von Xenopus laevis übersetzt. Ein wesentlicher Vorteil des Oozyten-Systems ist der Mangel an Spezies-Spezifität von mRNA, der die Übersetzung von Messengern verschiedenen Ursprungs erlaubt (57). In Froscheiern, die mit VLP-RNA injiziert wurden, ist eine deutliche Stimulation der Protein-synthetisierenden Aktivität im Bereich vom Molekulargewicht 6000 zu sehen, im Vergleich zu Kontrolleiern, die mit Salin injiziert wurden (Fig. 24). Da die Eichkurve in diesem Bereich keinen linearen Verlauf hat, ist es schwierig, das genaue Molekulargewicht zu bestimmen. Jedoch wurde das Molekulargewicht des Hauptproduktes von VLP-RNA auf 6000 geschätzt. Da die Translation der VLP-RNA nach ihrer thermischen Denaturierung erfolgt, codiert vermutlich eine 9 S bzw. 7 S Untereinheit der VLP-RNA für das Polypeptid von 6000. Es bestehen nun zwei Extremmöglichkeiten. Entweder besteht der Genomabschnitt von 4.5 % (Molgewicht ca. 1.8×10^6) aus mehreren hintereinander geschalteten oder über

das Genom verstreuten Kopien eines einzigen Gens für das 6000-Polypeptid oder aber nur ein Bruchteil, d.h. etwa 1/1o dieses Genomabschnitts besteht aus dem Gen für das 6000-Polypeptid und der übrige Teil codiert für andere RNA-Sequenzen. Diese Frage kann nur durch Messung der Hybridisierungsgeschwindigkeit entschieden werden.

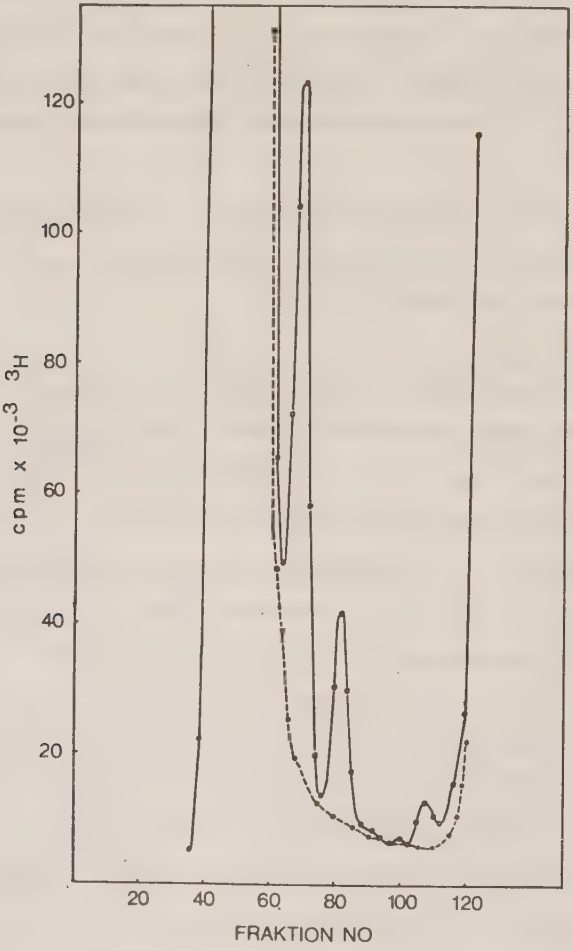


Fig. 24: Sephadex G-100 Filtration des [^{3}H]Leucin-markierten Translationsprodukts der VLP-RNA in Oozyten (o-o). Als Kontrolle dienten mit Salin injizierte Oozyten (●--●).

4. DISKUSSION

Ein gemeinsames Kennzeichne aller Neurospora-Mutanten mit mütterlichem Erbgang (extranukleare Mutanten) ist langsames Wachstum. Ein Teil dieser Mutanten ist ferner durch abnormale Morphologie und sexuelle Sterilität gekennzeichnet (28).

Die in dieser Arbeit untersuchte Mutante abnormal-3 erfüllt alle drei Kriterien. Sie hat jedoch folgende weitere genotypische und phänotypische Eigenschaften, die bisher, zumindest in dieser Kombination, in anderen Mutanten nicht auftreten:

1. Die mitochondriale DNA hat eine geringere Schwebedichte (34).
2. Der Gehalt an Cytochrom a,a_3 und b ist normal, der Gehalt an Cytochrom c ist reduziert (35).
3. Die mitochondriale ATPase ist Oligomycin-resistent (35).

Eine besonders auffällige Eigenschaft von abnormal-3 ist die intrazelluläre Produktion von virus-artigen Partikeln (VLP) (36).

Zwei Fragen sollten im Folgenden diskutiert werden: a) Welche Beziehungen bestehen zwischen VLP und Viren? und b) welcher Zusammenhang besteht zwischen der mitochondrialen Mutation und der Produktion von VLP in abnormal-3?

Um die erste Frage beantworten zu können, wurden die VLP morphologisch und chemisch genauer untersucht und mit Viren verglichen. Die Resultate ergaben eine verblüffende Analogie zwischen VLP und Membran-umhüllten RNA-Viren wie Tumorviren, Myxo-, Paramyxo-, Rhabdo- und Encephalo-Viren (74).
Diese Viren enthalten nämlich einen elektronendichten "Core", der von einer

Membran ("Envelop") umgeben ist. Ihre chemische Struktur läßt sich folgendermaßen verallgemeinern: Der Core besteht aus einem Komplex von hochmolekularer einzelsträngiger RNA und Proteinen, die zumindest zum Teil von dieser RNA codiert werden, und er ist umgeben von einer Membran die Glykoproteine enthält.

Alle diese Kriterien werden auch von VLP aus abnormal-3 erfüllt. Die Partikel zeigen in situ einen elektronendichten Core vom Durchmesser 50 - 70 nm, der von einem Envelop vom Durchmesser 100 bis 200 nm umgeben ist (75). Nach Isolation der VLP erscheint der Durchmesser von Core und Envelop variabler und im Durchschnitt größer zu sein als in situ, was sich leicht durch osmotisches Schwellen erklären läßt. Die sphärische Form und der Durchmesser des Envelops der VLP in situ stimmt besonders mit Tumor- und Myxoviren überein.

Wie obengenannte RNA-Viren enthalten auch VLP eine hochmolekulare, einzelsträngige RNA (Fig. 18 und 19, Tabelle II), die Messenger-Aktiviät besitzt (Fig. 24). Besonders interessant ist die Analogie zu Tumor-Viren: Charakteristisch für diese Viren ist eine 70 S RNA, die durch Denaturierung in kleinere Untereinheiten aufspaltet, wenngleich die Sedimentationskonstanten der nativen RNA (33 S) und der Untereinheiten (7 S bis 9 S) kleiner ist (Fig. 20 B und 22). Wie alle obengenannten RNA-Viren enthalten VLP ein Glykoprotein, das bevorzugt in der Membran lokalisiert ist (Fig. 13B und 16). Im Übrigen ist jedoch die Proteinstruktur der VLP wesentlich einfacher als die der RNA-Viren: Es lassen sich nur zwei Hauptkomponenten nachweisen, wobei das Lipoprotein vom Molgewicht 15 000 überwiegt (Fig. 10). Dieses Lipoprotein ist wahrscheinlich im Core lokalisiert, denn es ist für enzymatische Jodierung wesentlich schlechter zugänglich als das Glykoprotein (Fig. 16).

Indirekte Evidenz spricht dafür, daß die VLP-RNA für das Apoprotein des Lipoproteins codiert: Die VLP-RNA kann in Froscheiern in das gleiche Polypeptid vom Molgewicht etwa 6000 übersetzt werden (Fig. 24), das auch von einem submitochondrialen System aus abnormal-3 in vitro produziert wird (76). Dieses Polypeptid ist wahrscheinlich mit dem Apoprotein des Lipoproteins identisch aufgrund folgender Befunde: a) Die Aminosäure-Zusammensetzung von VLP-Lipoprotein ergibt ein Minimum-Molgewicht von 6000 (77) und b) das VLP-Lipoprotein wird in vivo an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert (26), d.h. es muß das in vitro synthetisierte primäre Translationsprodukt vom Molgewicht ca. 6000, wahrscheinlich als Dimeres, enthalten.

Falls diese Befunde durch strukturelle Vergleiche von VLP-Lipoprotein und in-vitro-Translationsprodukte von VLP-RNA erhärtet werden können, wäre dies eine weitere Analogie zu RNA-Viren, deren RNA mit Hilfe zell-freier Systeme in Virus-Proteine übersetzt werden kann (78,79). Ein wesentlicher Unterschied zu RNA-Viren ist das Fehlen jeglicher Enzyme der Nucleinsäure-Synthese, zum Beispiel der für Tumorviren charakteristischen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, "Revertase" (80). Damit fällt für die VLP aus abnormal-3 die Möglichkeit einer autonomen, von zellulärer DNA- und RNA-Synthese unabhängigen Vermehrung fort, was allerdings kein strenges Argument gegen die Virus-Natur der VLP darstellt, da auch Tumor-Viren ohne eigene Revertase ("defekte Viren") existieren können (81).

Eine weitere Besonderheit der VLP ist die lipophile Natur des Core-Proteins und der Lipidgehalt des Cores (36). Die Core-Proteine der RNA-Viren sind im allgemeinen nicht lipophil, und Lipide befinden sich nur im Envelop (82).

Die VLP unterscheiden sich grundsätzlich von fungalen Viren, die eine polyhedrale Symmetrie aufweisen und doppelsträngige RNA enthalten (siehe Einleitung).

Es erhebt sich nun die Frage, ob VLP virus-artige Funktionen ausüben oder nur aberrante abgelagerte Zellstrukturen darstellen. Eine Infektiosität von VLP konnte bisher nicht nachgewiesen werden, und wahrscheinlich sind VLP nicht in der Lage, Zellwände von Hyphen zu durchdringen. Das gleiche gilt auch für polyhedrale fungale Viren, die im allgemeinen nicht infiziös sind, es sei denn, sie dringen über Plasmabrücken (z.B. bei kopulierenden Hefezellen) in die Zelle ein (83). Es wäre deshalb interessant, eine mögliche virale Funktion durch Mikroinjektion in Wildtyp-Zellen zu testen.

Die bisherigen biochemischen Befunde lassen keinen Zweifel daran, daß die konstante intrazelluläre Produktion von VLP eine stabile phänotypische Eigenschaft von abnormal-3 darstellt. Hybridisierungsversuche (Fig. 23) haben klar gezeigt, daß die Information für VLP-RNA auch in Wildtyp-Zellen vorhanden ist, in der ja keine VLP nachgewiesen werden können. Daraus muß geschlossen werden, daß VLP aus normalen zellulären Genprodukten bestehen, die durch mutative Veränderung der Zelle umfunktioniert werden.

Zahlreiche Beobachtungen sprechen dafür, daß VLP innerhalb der Mitochondrien entstehen und aus mitochondrialen Genprodukten bestehen:

1. Ultradünnschnitte von abnormal-3 zeigen neben normalen auch aberrante mitochondriale Profile, in denen die lamellare innere Membran (Cristae) durch vesikuläre Membranstrukturen von der Größe der VLP ersetzt sind, wobei die äußere Membran erhalten bleibt. Die meisten typischen VLP-Profile finden sich in vakuol-artigen Strukturen, die möglicherweise aus Matrix-

und Cristae-freien Mitochondrien, also aus mitochondrialen "Ghosts" entstehen (75).

2. VLP können sowohl aus dem Cytoplasma (wahrscheinlich aus osmotisch geschockten "Vakuolen") als auch aus Mitochondrien isoliert werden (Seite 27).
3. Die VLP-Lipide enthalten Cardiolipin, ein typisches Lipid der mitochondrialen inneren Membran (36).
4. Die VLP-RNA ist ein Transkriptionsprodukt von mitochondrialer DNA (Fig. 23) und läßt sich in Froscheiern in ein Polypeptid übersetzen (Fig. 24), dessen Molgewicht mit dem des Hauptproduktes mitochondrialer Proteinsynthese in abnormal-3 übereinstimmt (76). Das mitochondriale Cistron für VLP-RNA zeigt keine Überlappung mit dem Cistron für ribosomale RNA (Tabelle III).

Damit erhebt sich die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Mutation und der Umfunktionierung mitochondrialer Gen-Produkte zu virusartigen Partikeln.

Für den Wildtypstamm von Neurospora konnte gezeigt werden, daß ein Hauptprodukt der durch mitochondriale DNA gesteuerten Proteinsynthese ein Proteolipid vom Molgewicht 12 000 darstellt (32). Dieses Protein ist wahrscheinlich identisch mit der von Tzagaloff isolierten kleinen Untereinheit von ATPase (84). In der Mutante abnormal-3, die ein verändertes mitochondriales Genom enthält, wird als mitochondriales Hauptprodukt ebenfalls ein Proteolipid synthetisiert, dessen Apoprotein jedoch wesentlich kleiner ist als das entsprechende Wildtyp-Protein (76). Dieses Proteolipid ist aber offenbar noch in der Lage, die innere mitochondriale Membran korrekt zu organisieren, lediglich die ATPase ist funktionell verändert (Oligomycin-Resistenz).

Das Lipoprotein von VLP stimmt in Molgewicht und Proteolipid-Charakter mit dem mitochondrial codierten Membranprotein von abnormal-3 überein und wird wahrscheinlich an mitochondrialen Ribosomen in vivo synthetisiert und von VLP-RNA bzw. mt-DNA codiert.

Die Biosynthese mitochondrialer Messenger-RNA und ribosomaler RNA ist in abnormal-3 nicht gestört, im Gegenteil, der Anteil an nativen mitochondrialen 80 S Ribosomen ist in abnormal-3 besonders hoch (Fig. 8).

Der entscheidende Effekt der mutativen Veränderung der mitochondrialen DNA und des mitochondrialen Gens für das Proteolipid (VLP-Lipoprotein) in abnormal-3 ist also offenbar eine Überproduktion von Messenger-RNA und Proteolipid, die zusammen mit Lipiden einen Komplex (Core) bilden. Über die biogenetische Herkunft des VLP-Envelops kann zur Zeit noch nichts gesagt werden; aufgrund morphologischer Befunde scheint die Bildung der Envelop-Membran auf Kosten der inneren mitochondrialen Membran vor sich zu gehen.

Nach diesem zum Teil noch zu untermauernden Schema wäre die Mutante abnormal-3 ein einzigartiges Modell zur Entstehung von Viren oder virus-artigen Partikeln aufgrund einer mutativen Veränderung eines zellulären Gens. Die Ähnlichkeit von VLP und Tumorviren mag zufällig sein, aber immerhin wird gerade von RNA-Tumorviren postuliert, daß sie durch vererbbare zelluläre Gene determiniert werden (85). Den VLP fehlen sicherlich noch einige Komponenten, z.B. Enzyme der Nucleinsäure-Replikation, um "echte" Viren zu werden. Das Beispiel der defekten RNA-Tumorviren, die ein "helper virus" zur Vermehrung benötigen, und die Fähigkeit nicht-infizierter Zellen, nach chemischer Induktion Tumorviren zu produzieren, zeigt jedoch, daß weder Infektiosität noch autonome Vermehrungsfähigkeit hinreichende Kriterien zu Charakterisierung von Viren sind

und daß die Grenze zwischen Zellstrukturen und Viren immer stärker verwischt. Es ist daher sicherlich eine attraktive Möglichkeit, die virus-artigen Partikel aus abnormal-3 als mögliche phylogenetische Vorstufen von RNA-Viren oder gar Tumor-Viren anzusehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Virus-artige Partikel (Virus-Like Particles, VLP) wurden aus Mitochondrien und Cytoplasma der mitochondrialen Mutante abnormal-3 von Neurospora crassa isoliert. Die Partikel sind in Wildtyp-Zellen nicht nachweisbar.

Die Analyse der Zellzusammensetzung in verschiedenen Phasen der Wachstumsperiode deutet auf eine Entstehung der VLP auf Kosten der Mitochondrien.

VLP aus abnormal-3 haben mit membranumhüllten RNA-Viren wie z.B. Tumorviren folgende Grundeigenschaften gemeinsam:
Sie bestehen aus einem elektronendichten Kern (Core), der von einer sphärischen Membran (Envelop) vom Durchmesser 0.1 bis 0.2 µ umgeben ist.
Sie sind aus Protein, RNA, Lipiden und Kohlehydraten zusammengesetzt. Der Kern enthält eine hochmolekulare einzelsträngige RNA von messenger-Aktivität und Protein, die Membran enthält Glykoprotein.
Die Hauptkomponenten der VLP-Proteine bestehen aus einem Lipoprotein vom Molgewicht 15 000 und einem Glykoprotein vom Molgewicht 95 000, wobei das Lipoprotein überwiegt.

Die RNA sedimentiert mit einem S-Wert von 33; nach der thermischen Denaturierung wird sie in kleinere Ketten umgewandelt, die hauptsächlich mit 9 und 7 S sedimentieren. Die gleichen S-Werte von nativer und dissoziierter RNA ergeben sich auch durch Polyacrylamid-Elektrophorese.

Die dissoziierte VLP-RNA wurde in Oozyten von Xenopus laevis übersetzt. Es ist eine deutliche Stimulation der Biosynthese eines Polypeptides vom Molgewicht ca. 6000 zu beobachten. Indirekte Evidenz spricht dafür, daß das von

VLP-RNA codierte Polypeptid das Apoprotein des Lipoproteins vom Molgewicht 15 000 darstellt.

Durch molekulare Hybridisierung wurde gezeigt, daß VLP-RNA von einem mitochondrialen Cistron codiert wird, das sich auch in Wildtyp-Zellen befindet und keine Überlappung mit dem mitochondrialen Cistron für ribosomale RNA zeigt.

Diese und weitere Beobachtungen sprechen dafür, daß VLP innerhalb der Mitochondrien aus überproduzierten, mutativ veränderten mitochondrialen Genprodukten entstehen.

ABKÜRZUNGEN

AMP	-	Adenosinmonophosphat
ATPase	-	Adenosintriphosphatase
BSA	-	Rinderserumalbumin
Cyt. c	-	Cytochrom c
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DNA	-	Desoxyribonucleinsäure
DNase	-	Desoxyribonuclease
EDTA	-	Äthylendiamintetraessigsäure
HCG	-	Human-chorionic Gonadotropin
IU	-	Internationale Einheiten
mt	-	mitochondrial
NDV	-	Newcastle-Disease-Virus
OD	-	Optische Dichte
PMS	-	Postmitochondrialer Supernatant
PNS	-	Postnuclearer Supernatant
RNA	-	Ribonucleinsäure
RNase	-	Ribonuclease
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
SSC	-	150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat
SVD	-	Schlangengiftphosphodiesterase
TCA	-	Trichloressigsäure
TEMED	-	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
VLP	-	Virus-artige Partikel
VSV	-	Vesicular-Stomatitis-Virus
ÜS	-	Überstand

LITERATURVERZEICHNIS

1. M. Chêvremont, S. Chêvremont-Comhaire und E. Baeckeland, Arch.Biol. (Liège) 70, 811 (1959).

2. M. Steinert, J.Biophys.Biochem.Cytol. 8, 452 (1960).

3. M.M.K. Nass und S. Nass, Exp.Cell.Res. 26, 424 (1962).

4. M.M.K. Nass und S. Nass, J.Cell.Biol. 19, 593 (1963).

5. H. Küntzel, Curr. Top. Microbiol.Immunol. 54, 94 (1971).

6. G. Schatz, Ann.Rev.Biochem. (1974), in press.

7. P. Borst, Ann.Rev.Biochem. 41, 333 (1972).

8. Y. Suyama und K. Miura, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 6o, 235 (1968).

9. A.C. Arnberg, E.F.J. Van Bruggen, R.B.H. Schutgens, A.R. Flavell und P. Borst, Biochim.Biophys.Acta 272, 487 (1972).

1o. H. Fukuhara, Mol.Gen.Genet. 1o7, 58 (197o).

11. L.H. Cohen, C.P. Hollenberg und P. Borst, Biochim.Biophys.Acta 224, 61o (197o).

12. K.P. Schäfer und H. Küntzel, Biochem.Biophys.Res.Commun. 46, 1312 (1972).

13. I.B. Dawid, J.Mol.Biol. 63, 2o1 (1972).

14. Y. Aloni und G. Attardi, J.Mol.Biol. 55, 271 (1971).

15. M. Wu, N. Davidson, G. Attardi und Y. Aloni, J.Mol.Biol. 71, 81 (1972).

16. Y. Kuriyama und D.J.L. Luck, J.Mol.Biol. 73, 425 (1973).

17. L. Reijnders und P. Borst, Biochem.Biophys.Res.Commun. 47, 126 (1972).

18. H. Küntzel, Nature 222, 142 (1969).

19. W. Neupert, W. Sebald, A.J. Schwab, P. Massinger und T. Büchner, Eur. J.Biochem. 1o, 589 (1969).

2o. P.M. Lizardi und D.J.L. Luck, J.cell.Biol. 54, 56 (1972).

21. H. Küntzel und H. Noll, Nature 215, 134O (1967).

22. O. Westergaard, K.A. Marcker und J. Keiding, Nature 227, 7o8 (197o).

23. Z. Barath und H. Küntzel, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 1371 (1972).

24. Z. Barath und H. Küntzel, Nature New Biol. 24o, 195 (1972).

25. E.S. Hawley und J.W. Greenawalt, J.Biol.Chem. 245, 3574 (197o).

26. H. Küntzel, I. Ali und H.C. Blossey in Proc.Intern.Conf. on the Biogenesis of Mitochondria (A.M. Kroon und C. Saccone, Eds.) (1973) Academic Press, N.Y., in press.

27. E. Ebner, T.L. Mason und G. Schatz, J.Biol.Chem. 248, 5369 (1973).

28. H. Bertrand und T.H. Pittenger, Genetics 71, 521 (1972).

29. I.B. Dawid in Mitochondria: Biogenesis and Bioenergetics; Biomembranes: Molecular Arrangements and Transport Mechanisms (S.G. Van der Bergh, P. Borst, L.L.M. Van Deenen, J.C. Riemersma, E.C. Slater und J.M. Tager, Eds.), Vol. 28, S. 35 (1972), North Holland/American Elsevier, Amsterdam.

3o. H.C. Blossey und H. Küntzel, FEBS Letters 24, 335 (1972).

31. D. Chuang und A. Weissbach, Arch.Biochem.Biophys. 157, 28 (1973).

32. H. Küntzel und H.C. Blossey, submitted to Eur.J.Biochem.

33. R. Michel und W. Neupert, Eur.J.Biochem. 36, 53 (1973).

34. H. Küntzel, Z. Barath, I. Ali, H.H. Althaus und H.C. Blossey in Regulation of Transcription and Translation in Eukaryotes (E.K.F. Bautz, Ed.), S. 195 (1973), Springer Verlag, Heidelberg.

35. N. Pieniazek und H. Küntzel, Manuskript in Vorbereitung.

36. H. Küntzel, Z. Barath, I. Ali, J. Kind und H.H. Althaus, Proc.Nat.Acad. Sci. USA 7o, 1574 (1973).

37. M. Hollings, Nature 196, 962 (1962).

38. H.A. Wood, R.F. Bozarth und P.B. Mislivec, Virology 44, 592 (1971).

39. G.T. Banks, K.W. Buck, E.B. Chain, J.E. Darbyshire, F. Himmelweit, G. Ratti, T.J. Sharpe und D.N. Planterose, Nature 227, 5o5 (197o).

4o. O. Volkoff und T. Walters, Can.J.Genet.Cytol. 12, 621 (197o).

41. R.W. Tuveson und J.F. Peterson, Virology 47, 527 (1972).

42. L. Garnjobst, J.F. Wilson und E.L. Tatum, J.Cell.Biol. 26, 413 (1965).

43. K.P. Schäfer, G. Bugge, M. Grandi und H. Küntzel, Eur.J.Biochem. 21, 478 (1971).

44. F. Sala und H. Küntzel, Eur.J.Biochem. 15, 28o (197o).

45. H.J. Vogel, Microbiol.Genet.Bull. 13, 42 (1956).

46. D. Fraser und E.A. Jerrel, J.Biol.Chem. 2o5, 291 (1953).

47. D.D. Brown und E. Littna, J.Mol.Biol. 8, 669 (1964).

48. O. Westphal und K. Jann in Methods in Carbohydrate Chemistry (R.L. Whistler, Ed.), Vol. V, S. 83 (1965), Academic Press, N.Y.

49. O.H. Lowry, H.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall, J.Biol.Chem. 193, 265 (1951).

5o. H. Noll, Nature 215, 36o (1967).

51. M. Uziel, C. Koh und W.E. Cohn, Anal.Biochem. 25, 77 (1968).

52. M. Sprinzl, F. von der Haar, E. Schlimme, H. Sternbach und F. Cramer, Eur.J.Biochem. 25, 262 (1972).

53. U.E. Loening, Biochem.J. 1o2, 251 (1967).

54. R.A. Weinberg, U. Loening, M. Willems und S. Penman, Biochemistry 58, 1o88 (1967).

55. D. Gillespie und S. Spiegelman, J.Mol.Biol. 12, 829 (1965).

56. P. Stanley und E.A. Haslem, Virology 46, 764 (1971).

57. J.B. Gurdon, C.D. Lane, H.R. Woodland und G. Marbaix, Nature 233, 177 (1971).

58. S. Zamenhoff in Methods in Enzymology (S.P. Clowick und N.O. Kaplan, Eds.) Vol. III, S. 7o2 (1957), Academic Press, N.Y.

59. W.E. Trevelyan und J.S. Harrison, Biochem.J. 5o, 298 (1952).

6o. S. Yamashita, Y. Doi und K. Yora, Virology 55, 445 (1973).

61. R. Datema, E. Agsteribbe und A.M. Kroon, Biochem.Biophys.Acta 335, 386 (1974).

62. W. Stoffel und H.G. Schiefer, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 1o17 (1968).

63. P.H. Duesberg, Curr.Top.Microbiol.Immunol. 51, 79 (197o).

64. R.P. Perry und D.E. Kelley, J.Mol.Biol. 16, 255 (1966).

65. S.U. Emerson und R.R. Wagner, J.Virol. 1o, 297 (1972).

66. J.F. Szilagyi und L. Uryvayev, J.Virol. 11, 279 (1973).

67. A. Scheid und P.W. Choppin, J.Virol. 11, 263 (1973).

68. J.J. Marchalonis, Biochem.J. 113, 299 (1969).

69. W.A. Rombants, W.A. Schroeder und M. Morrison, Biochemistry 6, 2965 (1967).

7o. A.R. Bellamy, L. Shapiro, J.T. August und W.K. Joklik, J.Mol.Biol. 29, 1 (1967).

71. S. Linn und I.R. Lehman, J.Biol.Chem. 241, 2694 (1966).

72. D.A. Clayton und R.A. Brambl, Biochem.Biophys.Res.Commun. 46, 1477 (1972).

73. E. Agsteribbe, A.M. Kroon und E.F.J. Van Bruggen, Biochem.Biophys.Acta 269, 299 (1972).

74. A. Lwoff und P. Tournier in Comparative Virology (K. Maramorosch und E. Kurstak, Eds.) (1971), Academic Press, N.Y.

75. F. Mayer und H. Küntzel, Manuskript in Vorbereitung.

76. I. Ali, G. Steinheider und H. Küntzel, Manuskript in Vorbereitung.

77. H. Küntzel, Manuskript in Vorbereitung.

78. W. Siegert, R.N.H. Konings, H. Bauer und P.H. Hofschneider, Proc.Nat. Acad.Sci. USA 69, 888 (1972).

79. A.L.J. Gielkens, M.H.L. Salden, H. Bloemendal und R.N.H. Konings, FEBS Letters 34, 145 (1973).

8o. H. Temin und D. Baltimore in Advance Virus Research, Vol. 17 (1972), Academic Press, N.Y.

81. H. Hanafusa und T. Hanafusa, Virology 43, 313 (1971).

82. H.D. Klenk in Biological Membranes (D. Chapman, D.F.H. Wallach, Eds.), Vol. 2, S. 145 (1973), Academic Press, N.Y.

83. P. Lhoas, Nature New Biol. 236, 86 (1972).

84. A. Tzagoloff, M.S. Rubin und M.F. Sierra, Biochim.Biophys.Acta 3o1, 71 (1973).

85. R. Huebner und G. Todaro, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 64, 1o87 (1969).

LEBENSLAUF

Name:	Iqbal Unnisa Ali
Geburtsdatum:	25. November 1944
Geburtsort:	Hyderabad Dn. (Indien)
Eltern:	Syed Yousuf Ali
	Razia Ali geb. Khan

Ausbildung:

1951 - 1959	Volksschule Hyderabad (Indien)
1960 - 1964	College Hyderabad (Indien)
1964 - 1967	Biochemie-Studium an der Universität Karachi (Pakistan)
1967 - 1969	wiss. Assistentin am physiologischen Institut der Universität Karachi (Pakistan)
Dez. 1969 - März 1970	Goethe-Institut, Boppard
April 1970 - Dez. 1971	Biochemie-Diplom an der Universität Tübingen
März 1972 - Febr. 1974	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, unter der Leitung von Herrn Dr. H. Küntzel.

Pakistanische Staatsangehörigkeit